



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Desarrollo de films nanoestructurados basados en el
silicio y polímeros biológicos con efecto inhibitorio
para el crecimiento de biofilms bacterianos

Eduardo Gonik

Mónica Cristina González

Dirección

Mónica Fernandez Lorenzo

Co-Dirección

Este trabajo de Tesina fue realizado en el Laboratorio de Especies Altamente Reactivas del INIFTA bajo la dirección de la Dra. Mónica Gonzalez, la codirección de la Dra. Mónica Fernandez Lorenzo y la tutoría del Lic. Damián Rodriguez Sartori.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción General	7
1.1. Infecciones Hospitalarias.	8
1.2. Biología de los Biofilms y su resistencia a las terapias antimicrobianas.	9
1.2.1. Etapas de formación de un biofilm.	10
1.2.2. Rol de los biofilms en la resistencia a los antimicrobianos.	12
1.3. Rol de <i>Staphylococcus aureus</i> y sus biofilms en infecciones hospitalarias	13
1.4. Estrategias para impedir la formación de biofilms y/o erradicarlos.	13
1.5. Tipos de superficies anti-biofilms y/o antimicrobianas	15
1.5.1. Superficies antiadherentes	15
1.5.2. Superficies que liberan antimicrobianos.	15
1.5.3. Superficies antimicrobianas al contacto.	16
1.5.4. Superficies fotosensibles que se transforman en antimicrobianas.	16
1.5.5. Superficies de efectos combinados.	16
1.6. Inactivación fotodinámica	17
1.7. Nanotecnología y nanopartículas.	18
1.8. Nanomateriales de Silicio	18
1.9. Efecto de PEG	18
1.10. Hipótesis y objetivos	20
2. Materiales y Métodos	21
2.1. Gases, solventes y reactivos	22
2.2. Medios de Cultivo bacteriano	22
2.2.1. Agar Nutritivo Britania	22
2.2.2. Caldo Nutritivo Britania	22
2.3. Técnicas de Sol-Gel	22
2.4. Material y equipamiento de uso frecuente en el Laboratorio	23
2.5. ATR-FTIR	23
2.6. Espectroscopía de absorción UV-Visible	25

2.6.1. Utilización de esfera integradora	26
2.7. Determinaciones de producción de $^1\text{O}_2$	27
2.8. Determinaciones de producción de O_2^{-1}	27
2.9. Formación de Films Finos por Dip Coating	29
2.10. Medidas de Fluorescencia	30
2.11. Laser Flash Fotólisis	30
2.12. Estudio de superficies mediante microscopía de epifluorescencia	32
2.13. Medida de Ángulo de contacto	32
2.14. Metodologías aplicadas a ensayos microbiológicos	33
2.14.1. Preparación del Inóculo	33
2.14.2. Inoculación de vidrios modificados	34
2.14.3. Ensayos de inactivación fotodinámica	34
2.14.4. Irradiación de vidrios modificados	35
2.14.5. Recuento de Unidades Formadoras de Colonia(UFC)	35
3. Síntesis y Caracterización de Quantum Dots	37
3.1. Introducción	38
3.2. Reacciones de Síntesis.	39
3.2.1. Síntesis de SiQD - PEG	39
3.2.2. Síntesis de SiQD	40
3.3. Caracterización de Quantum Dots	40
3.3.1. ATR - FTIR	40
3.3.2. Matrices de Excitación-Emisión	42
3.3.3. Espectro UV-VIS	43
3.3.4. Laser Flash Fotólisis	43
3.3.5. Determinación de Estabilidad de SiQD's	44
3.4. Conclusiones Parciales	45
4. Formación y caracterización de films basados en sílice. Ensayos microbiológicos.	47
4.1. Introducción	48
4.2. Optimización en la formación de films	48
4.2.1. Formación de films.	48
Ensayo 1: Formación de films por volcado y evaporación. Evaluación del efecto de la temperatura y la concentración de SiQDs	48
Ensayo 2: Formación de films por Dip Coating. Evaluación del efecto de la temperatura y número de repeticiones.	50
Ensayo 3: Dip Coating con secado en caliente. SiQD-PEG disueltas en EtOH	52
4.3. Caracterización de Films	53
4.3.1. Ángulo de Contacto	53
4.3.2. Espectro UV-VIS	54
4.3.3. ATR-FTIR	55
4.3.4. Producción de ROS	57
Radical Anión Superóxido	57
Oxígeno Singlete	57
4.4. Ensayos Microbiológicos	58
4.4.1. Inactivación fotodinámica durante la colonización de superficies.	58
4.4.2. Inactivación fotodinámica de biofilms de 2hs	59

4.4.3. Microscopía de campo claro.	60
Ensayo de inactivación fotodinámica durante la colonización de superficies. .	60
Ensayo de inactivación fotodinámica de biofilms de 2hs	62
4.5. Conclusiones Parciales	64
5. Conclusiones Finales y perspectivas futuras	66
5.1. Conclusiones Finales	67
5.2. Perspectivas futuras	67
Agradecimientos	69
Bibliografía	70

SIGLAS Y ABREVIATURAS DE USO FRECUENTE

ROS Especies Reactivas de Oxígeno	ATR Reflectancia Total Atenuada.
¹O₂ Oxígeno Singlete.	FTIR Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
O₂⁻ Radical Anión Superóxido.	SiQD Quantum Dot de silicio.
PEG Polietilenglicol.	SiQD - PEG Quantum Dot de silicio funcionalizada con polietilenglicol.
TEOS Tetraetilen Ortosilicato.	Abs_{xxx} Absorbancia en medio acuoso (baseline " <i>agua-agua</i> ") a $\lambda = \text{xxx nm}$
DMF N,N-dimetil Formamida.	Abs[*]_{xxx} Absorbancia en medio etanol (baseline " <i>etanol-etanol</i> ") a $\lambda = \text{xxx nm}$
QD Quantum Dot.	DO_{xxx} Densidad Óptica a $\lambda = \text{xxx nm}$
SiQD Quantum Dot de Silicio.	mQ MiliQ
EPS Exo Polisacárido.	nm Nanometro (10^{-9}m)
UV Ultravioleta	
IR Infrarrojo	
EM Electro-Magnetica (Radiación).	

CAPÍTULO

I

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Infecciones Hospitalarias.

Una causa prevalente de muerte dentro de la población son las infecciones adquiridas bajo cuidado hospitalario, esto es, infecciones que no padecían los pacientes ni se encontraban en periodo de incubación antes de ingresar al nosocomio. La gravedad de la situación urgió a la organización mundial de la salud a promover en 1981 una Comisión para la vigilancia, control y prevención de infecciones hospitalarias[1], que desde entonces se recopila la información plasmada en artículos científicos sobre esta temática [2]. Se estima que este tipo de infecciones afectaba a un 7.6 % de la población hospitalaria en países desarrollados y a un 10.1 % en países en vías de desarrollo. Dentro de dicha población hospitalaria los pacientes más vulnerables son los alojados en unidades de cuidados intensivos o de terapia intensiva (UTI), en las que ocurren más del 20 % de los eventos de infección hospitalaria[3].

Los pacientes en estas condiciones son particularmente sensibles a infecciones oportunistas debido a que normalmente tienen o pueden tener algún tipo de disfunción inmunológica, además de que sus barreras inmunes pasivas son socavadas por el uso de dispositivos invasivos, tales como catéteres o vías intravenosas (que pueden actuar como puntos de entrada para microorganismos patogénicos). La colonización bacteriana de superficies no se limita a dispositivos implantables, ya que las superficies propias de las salas de emergencias, tales como picaportes, mesadas, sábanas, etc. son también vulnerables y por tanto constituyen un punto de posible infección. Otra causa posible de sensibilidad es el uso de drogas que pueden predisponer a los pacientes a la infección[4].

La problemática asociada a la contaminación de superficies ha sido expuesta en un trabajo por Carling y Bartley [5]. En ella se observó que pacientes alojados en habitaciones de terapia intensiva previamente ocupadas por pacientes infectados con enterocos resistentes a vancomicina, *Staphylococcus* resistente a meticilina, *Clostridium difficile* y/o *Acinetobacter baumannii* tenían en promedio, un 73 % más de probabilidades de ser infectados con estos microorganismos que pacientes alojados en habitaciones sin ocupación previa. Esto sugiere la permanencia de microorganismos en el ambiente aún después de que los pacientes infectados hayan abandonado la habitación.

Por otra parte, aproximadamente un 65 % de las infecciones hospitalarias reportadas se deben a la formación de formas diferenciadas de crecimiento bacteriano denominados biofilms. Estos últimos se definen como poblaciones (homogéneas o heterogéneas) de bacterias embebidas en una matriz que les permite adherirse a superficies y entre ellas. Vale la pena recordar que las bacterias pueden existir en la naturaleza bajo dos formas o estados: bacterias planctónicas, de libre flotación y suspendidas en el fluido y bacterias sésiles (formadoras de biofilm) que crecen en colonias de microorganismos adheridas a superficies sólidas. El biofilm representa un modo protegido de crecimiento para los microorganismos. En él las bacterias forman redes complejas de colaboración fisiológica capaz de facilitarles un modo de vida mucho más eficiente, en contraposición a la vida libre [6, 7, 8, 9].

Otro factor que influye en la prevalencia de infecciones hospitalarias y en la morbilidad asociada es la propagación de microorganismos multi-resistentes [10, 11, 12]. Estos son microorganismos patogénicos que presentan variados grados de resistencia a una multiplicidad de antibióticos de uso hospitalario. Es de destacar que en 1961 se informó la aparición de *S. aureus* resistente a la metilcilina (MRSA), tan solo dos años después del descubrimiento de la droga[13]. Esta cepa, junto con otras cepas resistentes de *Pseudomonas aeruginosa*[14], *Haemophylus influenzae*[15] y *Klebsiella pneumoniae*[16], entre otras, constituyen uno de los desafíos más grandes para la medicina moderna, debido a que poco a poco los mecanismos de resistencia continúan acotando las opciones de tratamiento para infecciones bacterianas. En las UTI representan una amenaza de particular envergadura, donde se estimó que una infección con microorganismos multi-resistentes aumentaría la mortalidad de pacientes en un 500 %[17, 18, 19]. Paradójicamente, la sala de emergencias es

también un punto álgido para la diseminación y propagación de estos microorganismos; en gran medida debido al uso extendido de agentes antimicrobianos que ejercen una presión a la selección natural hacia el surgimiento de resistencias múltiples[20, 21].

1.2. Biología de los Biofilms y su resistencia a las terapias antimicrobianas.

A lo largo de los párrafos anteriores se estableció la importancia que tiene abordar el estudio de los biofilms en el marco de la salud y las infecciones en contextos hospitalarios. En esta sección se indagará sobre las características biológicas de los biofilms, y cómo estas características juegan un rol en la problemática hospitalaria.

La forma de vida en biofilm (estado sésil) representa la condición de vida de un 99 % de las bacterias[22, 23, 24], razón por la cual adquieren importancia en los distintos procesos en los que participan las bacterias. Rodney Donlan[25] definió en el año 2001 a los biofilms como “una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancia poliméricas extracelulares que ellas han producido y que exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica”. En esta definición se destaca un punto muy importante del crecimiento de las bacterias en los biofilms y es que el modo de vida sésil produce cambios fisiológicos profundos en las bacterias al compararlas con sus contrapartes planctónicas. Adicionalmente, la protección física que confiere la biopelícula permite a las bacterias subsistir en ambientes desfavorables. Cabe destacar que dentro del biofilm las comunidades de bacterias se encuentran adheridas y embebidas a un material polimérico producido por ellas mismas denominado exopolisacárido (EPS). Este material es químicamente complejo y está compuesto principalmente por polisacáridos, incluyendo además lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, entre otras biomoléculas.[26]. Se ha publicado que al formar biofilms se reduce la susceptibilidad de las bacterias a la acción de agentes antimicrobianos [27, 28, 29] y en el caso de las bacterias del interior disminuye la estimulación de su replicación[30]. Adicionalmente el EPS actúa como una barrera física para la difusión de los biocidas y reduce la sensibilidad ante los mismos[31].

La combinación de técnicas de observación tridimensionales de alta resolución, colorantes moleculares específicos fluorescentes y los equipos necesarios para el cultivo de biofilms han demostrado que las biopelículas no son simples agregados pasivos de células que están adheridas a una superficie, sino que son sistemas biológicos complejos desde el punto de vista dinámico y estructural. Esta complejidad está delimitada por un sofisticado sistema de señalización y especialización celular[32].

Para poder comenzar a descifrar la estructura de los biofilms hizo falta el advenimiento de la microscopía confocal de barrido que permitió observar que las bacterias sésiles crecen dentro de microcolonias embebidas en una matriz polimérica que incluye canales abiertos. Este tipo de estructura abierta permite que el agua, presente en el ambiente en donde se desarrolla el biofilm, pueda penetrar a través de los canales y por lo tanto los nutrientes lleguen a zonas profundas de la microcolonia dentro de la comunidad del biofilm. El intercambio de nutrientes, facilitado por la arquitectura del biofilm, permite que estas comunidades desarrollen un espesor y una complejidad considerable mientras que las células individuales que las componen se mantienen en óptimas condiciones nutricionales, en muchas ubicaciones dentro del biofilm[6].

1.2.1. Etapas de formación de un biofilm.

En esta sección se muestra una descripción de como un microorganismo forma biofilms sobre una superficie inanimada. Vale la aclaración de que si bien las etapas de crecimiento no son iguales para todos los microorganismos, esta descripción, que se muestra gráficamente en la figura 1.1 sirve como una generalización de los procesos que ocurren en la interfase sustrato/ solución [7].

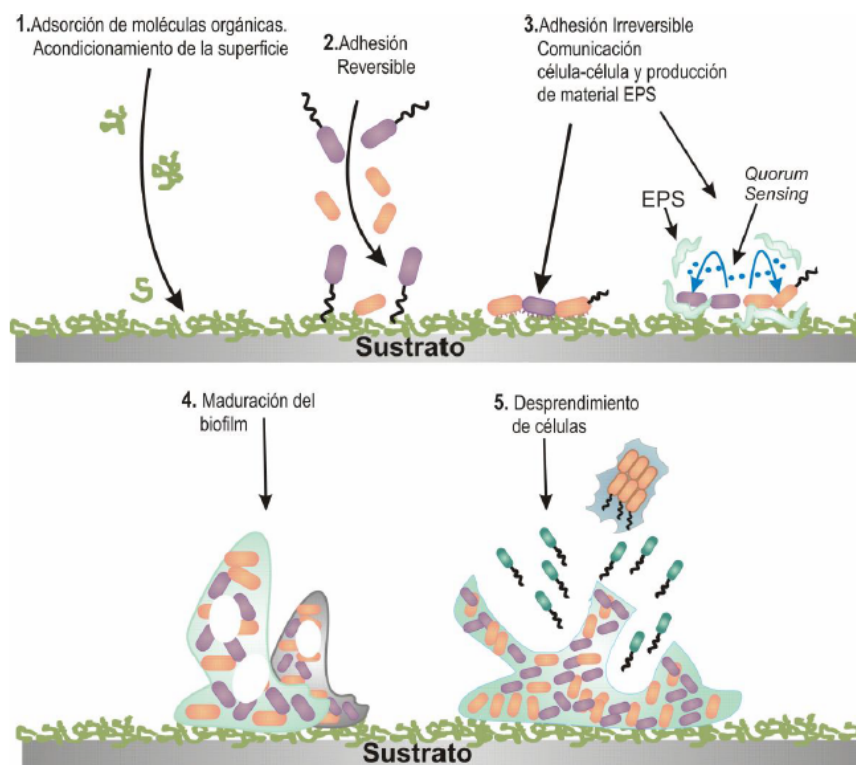


Figura 1.1: Etapas de formación del biofilm

Etapas I Adhesión y formación de monocapa.

Las bacterias de vida libre se pueden adherir rápidamente al encontrar una superficie abiótica. Los factores que condicionan la interacción con la superficie se pueden dividir en dos categorías[33]:

- **Factores físicos:** Los factores físicos más importantes son la tensión de corte, temperatura, rugosidad, topografía y carga superficial. Estos factores influyen en el transporte, los fenómenos interfasiales, el desprendimiento y las reacciones en la interfase.
- **Factores químicos:** Los factores químicos son numerosos, algunos de los más importantes son: la composición de la superficie del sustrato, la composición del medio en el que se desarrolla el biofilm, el pH, el oxígeno disuelto.

Al adsorberse materia orgánica presente en el medio sobre la superficie en cuestión, forma una cobertura denominada “película acondicionante” que cambia las propiedades químicas y físicas de la interfase sustrato/fluido tornándola más amigable para la adhesión bacteriana. El film o película condicionante resulta un punto de interacción para las adhesinas (proteínas superficiales bacterianas) que median la unión de las bacterias a la superficie [34].

Etapas II Adhesión reversible

También es conocida como adhesión primaria y se puede dar mediante dos tipos de mecanismos:

- **Mecanismos activos:** Pueden depender de órganos especializados, ya sea flagelos y fimbrias para poder alcanzar las superficies venciendo fuerzas repulsivas que ejerza la superficie o de proteínas de superficie que pueden mediar en la adhesión de las bacterias a una determinada superficie.
- **Mecanismos pasivos:** La adhesión puede también ser ayudada por fuerzas gravitatorias o por mecanismos de difusión y precipitación.

Una vez que las células se encuentran cerca de la interfaz, interacciones de largo alcance entre las células y la superficie del sólido, determinan si la bacteria será atraída o no a la misma[35, 36, 37].

Etapas III Adhesión Irreversible

El punto de división entre las interacciones consideradas como adhesión reversible y adhesión irreversible habitualmente está mediado por presencia de polímeros y apéndices extracelulares con los que las células establecen un enlace permanente con la superficie, esta transición también está conjugada con profundos cambios fisiológicos en las células[38].

Es también en esta etapa cuando se dan interacciones químicas entre bacterias y superficie, mediadas por estructuras poliméricas como fibrilas, fimbrias, pilis y exopolisacáridos (EPS). La adhesión irreversible específica puede ser definida como la especificidad de unión entre las adhesinas bacterianas (un componente específico de la superficie del material o tejido superficial) y un receptor del sustrato (componente específico de la superficie del material o tejido superficial), en este caso, los factores ambientales (pH, electrolitos y temperatura) afectan en menor medida dichos procesos.

Etapas IV: Maduración del biofilm

La continuación de los procesos naturales del biofilm entre ellos la replicación y muerte de bacterias, la secreción de moléculas y la continuación de las interacciones químicas con el medio van aumentando gradualmente la complejidad y densidad de los biofilms [6].

Existen al mismo tiempo procesos que limitan el crecimiento del biofilm, por ejemplo, la penetración de los nutrientes dentro del biofilm y la eliminación de residuos. Otros factores que pueden controlar la maduración del biofilm son el pH interno, la penetración de oxígeno y fuentes de carbono y la osmolaridad.

Etapas V: Desprendimiento

Se sabe que el proceso de desprendimiento es sumamente complejo, aunque el estudio de su funcionamiento básico no ha sido profundamente investigado, ya que los trabajos se han focalizado en el estudio de formación de los biofilms, por su importancia en la industria, medicina, etc.[9]. Sin embargo el proceso de desprendimiento de microorganismos desde las biopelículas resulta un fenómeno sumamente complejo e importante tanto en medicina[39] como en la industria.

Se solía creer que el proceso de desprendimiento estaba asociado a fenómenos pasivos, ya sea por cambios en la dinámica del fluido circundante o por disminución del abastecimiento nutricional[38, 40], sin embargo en los últimos años se postuló que este proceso podría ser en cambio un proceso activo controlado por distintas vías de señalización. En un trabajo del año 2003, Hunt y colaboradores modelaron cómo ocurriría el proceso de desprendimiento si este estuviese causado por un factor molecular hipotético, luego sus predicciones se comprobaron con diversos biofilms de *Staphylococcus aureus*[41].

Un factor importante a destacar es que, probablemente, un conglomerado desprendido del biofilm podría conservar características genotípicas y fenotípicas del mismo, como por ejemplo resistencia antimicrobiana, mientras que las células bacterianas que son liberadas aisladamente parecen volver rápidamente a su fenotipo planctónico, tornándose nuevamente susceptibles a los mecanismos de defensa del huésped así también como a antimicrobianos. Este concepto se ampliará en la próxima sección.

1.2.2. Rol de los biofilms en la resistencia a los antimicrobianos.

Como se mencionó anteriormente, los biofilms representan el modo más frecuente de crecimiento bacteriano, por ello, resulta primordial analizar el rol que este modo de desarrollo tiene en la efectividad de los tratamientos antimicrobianos. De hecho, hay mucha investigación focalizada en este tema, y parte de ella se resumirá en los próximos párrafos.

En los últimos años se ha podido concluir que los mecanismos de resistencia a antimicrobianos tradicionalmente asociados con bacterias planctónicas, tales como la presencia de bombas de efluencia (para expulsar estas moléculas fuera de la célula) o enzimas modificadoras de antibióticos, no constituyen los mecanismos principales de resistencia ante antimicrobianos en biofilms [27, 42]. De hecho, se ha demostrado que bacterias que en modo de vida planctónico son completamente sensibles a un determinado agente antimicrobiano, al formar biopelículas se muestran parcialmente resistentes a concentraciones del mismo biocida que antes eran inhibitorias del crecimiento [43].

Varios de los mecanismos de resistencia que se han propuesto en bibliografía están asociados con la presencia de EPS en los biofilms. Se ha observado que la adsorción de antibióticos y antisépticos sobre los diversos polímeros componentes del EPS retrasa y obstaculiza su penetración dentro de la biopelícula[44, 45, 46]. También la presencia de polímeros cargados negativamente puede frustrar la penetración de antimicrobianos como los aminoglucósidos cargados positivamente[47].

Por otro lado, el microambiente que se da en el interior del biofilm parece cumplir una función en la efectividad de los antimicrobianos, ya que la atmósfera desprovista de oxígeno que se genera en las capas más profundas del biofilm ha mostrado disminuir su efectividad [48, 49]. Otro factor de gran importancia en el entendimiento de la resistencia ante antimicrobianos es la presencia de las células denominadas persistentes. Estas células constituyen una subpoblación que no se divide y que posee un metabolismo aletargado. La ventaja que posee la existencia de estas células persistentes para el biofilm es que éstas no se reproducirán en presencia de un agente antimicrobiano y podrán resistirlo, a diferencia del resto de la población del biofilm. Una vez que la concentración del antibiótico disminuya, se dividirán regenerando el biofilm. Este tipo de comportamiento se ha definido en bibliografía como recalcitrancia, ya que no se ajusta totalmente ni a la definición de tolerancia, ni a la definición de resistencia[50]. Actualmente se considera que este mecanismo es el que explica la mayor parte de la resistencia diferencial del biofilm[51].

1.3. Rol de *Staphylococcus aureus* y sus biofilms en infecciones hospitalarias

S. aureus es un microorganismo anaerobio facultativo, coco gram-positivo, inmóvil y no esporulado que se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo. Es un patógeno humano importante que coloniza e infecta a pacientes hospitalizados y a personas inmunocompetentes. Produce patologías diversas desde un absceso de piel hasta septicemias mortales y choque tóxico estafilocócico. Puede ser causante de intoxicación por alimentos, debido a la ingestión de la enterotoxina B termoestable preformada, producida por una cepa toxigénica[52].

Su variante resistente a la meticilina, conocida como MRSA (*Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*) representa una carga muy importante sobre el sistema de salud, siendo la principal responsable de infecciones epidérmicas y de tejidos blandos[53], segunda responsable de infecciones hospitalarias del torrente sanguíneo[54] y responsable del 64 % de las infecciones por *S. aureus*[55]. Además, se ha reportado la existencia de MRSA que presenta otras resistencias[56], incluyendo la resistencia cada vez mayor a la vancomicina[54].

Otro factor de importancia al explorar la problemática de las infecciones hospitalarias por *S. aureus* es su capacidad de formar biofilms en superficies consideradas sensibles para una infección, ya sea sobre materiales implantables (ver figura 1.2) o distintas superficies con las que un paciente podría tomar contacto dentro de un hospital[31, 57, 58]. Los biofilms de *S. aureus* son sumamente recalcitrantes y su eliminación de cualquier tipo de material resulta sumamente complejo[31]. De hecho, en la figura 1.2 se puede observar que *S. aureus* forma biofilms y por tanto coloniza, una variedad de materiales implantables.

Es por las razones expuestas en los párrafos anteriores que se seleccionó al *S. aureus* como organismo formador de biofilms modelo para los ensayos del presente trabajo de tesina.

Table 1. Incidence and causative agents of infections associated with commonly used medical devices and implants [1,2,9–18]

Implants or devices	Major causative organisms*	Infection incidence over life of device
Urinary catheter	<i>Escherichia coli</i> , <i>Candida</i> spp., CoNS, <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	33%
Central venous catheter	CoNS, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2–10%
Peritoneal catheter	<i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida</i> spp.	3–5%
Mechanical heart valve	CoNS, <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.	1–4%
Ventricular assist device	CoNS, <i>S. aureus</i> , <i>Candida</i> spp., <i>P. aeruginosa</i>	13–80%
Coronary stents	<i>S. aureus</i> , CoNS, <i>P. aeruginosa</i> , <i>Candida</i> spp.	<0.1%
Cardiac pacemakers	<i>S. aureus</i> , CoNS, <i>Streptococcus</i> spp., <i>Candida</i> spp.	0.1–20%
Vascular grafts	<i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp.	1–6%
Contact lenses	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>S. aureus</i>	0.1%
Intraocular lenses	<i>S. epidermidis</i>	0.1–0.5%
Fracture fixation devices	CoNS; <i>S. aureus</i> , <i>Propionibacterium</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp.	5%
Hip/knee implants	<i>S. aureus</i> , CoNS, <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterobacteriaceae</i>	0.5–4%
Dental implants	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Actinomyces</i> spp., <i>Porphyromonas</i> spp., <i>Prevotella</i> spp.	5–8%
Penile implants	CoNS; <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.	2–5%
Pelvic organ prolapse mesh	CoNS; <i>Streptococcus</i> spp., <i>P. mirabilis</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Actinomyces</i> spp.	0–8%
Cochlear implants	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus</i> spp.	1.4–17%
Sutures	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , CoNS, <i>Peptostreptococcus</i> spp., <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>Serratia</i> spp.	Unknown
Breast implants	<i>S. aureus</i> , CoNS, <i>Streptococcus</i> , <i>Propionibacterium</i> spp.	1–2.5%

*Abbreviations: CoNS, coagulase negative staphylococci; spp., species.

Figura 1.2: Porcentaje de incidencia y agentes causales asociados con dispositivos médicos e implantes. Tomado de [59]

1.4. Estrategias para impedir la formación de biofilms y/o erradicarlos.

A lo largo de las secciones anteriores se mencionó la importancia de las infecciones hospitalarias como problemática de salud pública, se mencionó también el rol que cumple la colonización

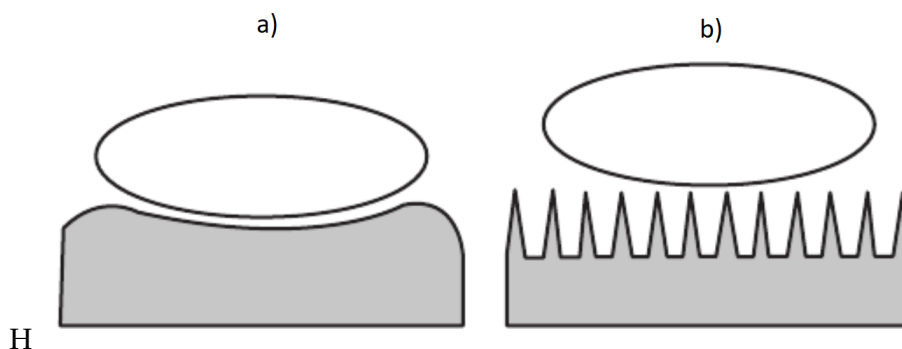


Figura 1.3: Representación de la interacción de una célula bacteriana con superficies de distinta topografía. Adaptada de [68].

bacteriana de estas superficies mediante la formación de biofilms y las razones por las cuales la terapia con antimicrobianos no resulta adecuada, o al menos suficiente para erradicar biofilms recalcitrantes. Entonces se concluye que para la solución de este problema debe aplicarse un enfoque novedoso.

Una posibilidad que ha ganado bastante popularidad es el desarrollo de recubrimientos antimicrobianos para los materiales sensibles a la colonización. Una importante ventaja de esta estrategia es que no es necesaria la modificación de las propiedades globales del material en cuestión, que ya han sido optimizados para su función.

Teniendo en cuenta que un paso fundamental para la formación de biofilms es el acondicionamiento de la superficie mediante la adsorción o deposición de distintas sustancias orgánicas que permiten o facilitan la adhesión de bacterias [60, 61, 62], resulta de interés el diseño de superficies con propiedades antiadherentes, de tal manera de inhibir la formación de la película acondicionante y/u obstaculizar los procesos de adhesión. Para lograr esto, una herramienta importante de diseño es la topografía de la superficie ya que, genéricamente hablando, si las rugosidades son aproximadamente de la escala de las bacterias puede favorecerse la adhesión, debido a que se maximiza el área de contacto microorganismo/superficie[63] (figura 1.3 a)), mientras que si las rugosidades tienen una escala mucho menor que el tamaño de las células, el área de contacto se minimiza, y por tanto la adhesión se desfavorece (figura 1.3 b)) [64]. Por otra parte, rugosidades en el orden del tamaño de las bacterias (aproximadamente $1\ \mu\text{m}$ en el caso de *S. aureus*) dificultan la replicación de las mismas [63, 65, 66, 67].

Si bien la topografía cumple un rol crucial en el diseño de recubrimientos antimicrobianos, para minimizar la posibilidad de contaminación, se busca que las superficies presenten otras propiedades que actúen en sinergia con la topografía. Estas propiedades pueden estar dadas por la presencia de compuestos bactericidas, fotosensibilizadores, etc. Es también importante que, al producir la muerte de las bacterias, estas no queden adheridas a la superficie del recubrimiento, ya que esto progresivamente haría que se forme una película acondicionante. Por estas razones, [59] propuso cuatro lineamientos que deberían ser tenidos en cuenta a la hora de diseñar una película antimicrobiana.

Las películas antimicrobianas deben...

I Proveer una topografía que sea desfavorable para la adhesión microbiana

II Prevenir la adsorción de biomoléculas.

III Matar a los microbios que logren adherirse.

IV No retener microbios muertos en la superficie del material.

1.5. Tipos de superficies anti-biofilms y/o antimicrobianas

El desarrollo de superficies antimicrobianas se puede dividir en distintas categorías, de las que solo se describirán las más importantes:

1.5.1. Superficies antiadherentes

Estos tipos de superficies pueden reducir la fuerza de interacción entre las células bacterianas y la superficie sólida con el objetivo de desfavorecer la formación de biopelícula[69]. Normalmente este tipo de superficies se logran mediante la modulación de la topografía y de la química superficial

Como se mencionó en la sección anterior, cuando la dimensión característica de las estructuras topográficas es varias veces mayor al tamaño de la célula, permitiendo su replicación, se tiende a favorecer la adhesión bacteriana, mientras que las de dimensiones similares la inhiben [63, 70]. Adicionalmente, en superficies nanoestructuradas (cuya dimensión característica es más de un orden menor que el tamaño de la célula) ciertas bacterias presentan patrones alterados de desarrollo; esto es, tienden a alinearse con las rugosidades de la superficie, a disminuir su tamaño y a formar más EPS[63], posiblemente para generar un efecto acondicionante.

Otra alternativa es la generación de superficies superhidrofóbicas mediante el diseño detallado de la topografía. Este tipo de superficies se basan en el llamado “efecto de hoja de loto” que toma su nombre de la planta de loto y su gran capacidad hidrofóbica relacionada con la topología de su superficie. Esta superficie consiste en una serie de papilas de aproximadamente 10 mm de ancho y 15 mm de alto que logran atrapar burbujas de aire entre ellas. De esta forma, gran parte de la superficie permanece cubierta por burbujas y cuando una gota de agua se deposita sobre esta superficie, su ángulo de contacto será grande ($\sim 150^\circ$). Esto genera que las gotas de agua rueden fácilmente arrastrando partículas depositadas sobre la superficie. Las superficies biomiméticas que comparten estas propiedades han demostrado características que desfavorecen la formación de biofilms[71, 72].

Existen también varias estrategias relacionadas con la modificación química de las superficies para desfavorecer la adhesión bacteriana. Algunas de las técnicas más utilizadas se relacionan con la inmovilización de polímeros hidrofílicos de cadena larga como el PEG y polímeros zwitterionicos con poca capacidad de adsorción de proteínas. De esta forma se impide la formación de una capa acondicionante y en consecuencia se inhibe la adhesión de bacterias. Se ha sugerido [73] que la efectividad de estas coberturas hidrofílicas se debe a la barrera física y energética que ejercen sus capas de hidratación.

1.5.2. Superficies que liberan antimicrobianos.

Este tipo de superficies ejercen su actividad mediante la liberación de compuestos antibacterianos a lo largo del tiempo, pudiendo afectar a bacterias adheridas próximas a la superficie. Si se compara esta forma de administrar antimicrobianos con los métodos tradicionales, se encuentra como ventaja que la liberación localizada permite generar altas concentraciones de droga sólo en el área donde es necesaria, disminuyendo el riesgo de estimular la generación de resistencia al compuesto en cuestión.

Existen distintas formas de generar superficies liberadoras de antimicrobianos: se pueden embeber superficies porosas con compuestos de Ag (sales o nanopartículas), complejos de yodo, etc. [74, 75]; también se puede atrapar un biocida generando superficies por un método capa por capa (LbL)[76], o retener compuestos en una matriz polimérica que se hidrolice paulatinamente, permitiendo la liberación lenta de biocidas[77]. El inconveniente que tienen todos los métodos citados es que la liberación del biocida, y por tanto el agotamiento del “reservorio” es relativamente rápido, con lo cual la utilidad de la superficie a largo plazo se reduce.

1.5.3. Superficies antimicrobianas al contacto.

Entre las desventajas que poseen las superficies que liberan antimicrobianos, aún cuando la liberación de los agentes antimicrobianos que contienen sea paulatina, concierne al agotamiento del reservorio con lo que se termina la utilidad de la superficie. Para prolongar el tiempo de vida útil de la superficie, se desarrollaron superficies con compuestos antimicrobianos anclados [78]. Estos compuestos suelen ser polímeros con carga positiva o enzimas que se anclan a la superficie mediante polímeros de cadena larga. Se cree que en ambos casos ocurre la desorganización de la membrana plasmática de la bacteria; la penetración de la envoltura microbiana es facilitada por las cadenas con las que se unen a la superficie- [78, 79].

1.5.4. Superficies fotosensibles que se transforman en antimicrobianas.

Otra metodología alternativa a la liberación de antimicrobianos por parte de las superficies es el diseño de superficies que puedan generar antimicrobianos por medio de procesos catalíticos que median la producción de agentes activos. De esta forma se elimina la problemática del agotamiento del compuesto activo. La mayoría de los esfuerzos relacionados con este tipo de metodologías se centraron en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que son compuestos derivados del oxígeno molecular (O_2) sumamente reactivos y que pueden ser utilizados como biocidas como: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical anión superóxido (O_2^-) y el oxígeno singlete (1O_2), entre otros. Su capacidad de dañar distintas estructuras celulares está siendo activamente estudiada[80, 81].

Para poder catalizar la formación de estas especies biocidas, se necesita proveer alguna forma de energía, siendo la radiación electromagnética la forma más usada aunque existen superficies catalíticas que utilizan energía eléctrica.

Uno de los materiales más usados para construir superficies catalíticas es el TiO_2 fotocatalítico. Este material es capaz de catalizar la formación de diversas especies reactivas de oxígeno en medio acuoso, en presencia de oxígeno, con irradiación UV[82, 83]. Por otro lado, también se han desarrollado superficies que contienen diversas moléculas orgánicas que, de forma similar a el TiO_2 catalizan la formación de diversas ROS[84] .

1.5.5. Superficies de efectos combinados.

Si bien todos los métodos de modificación superficial mencionados en las secciones anteriores han tenido demostrada utilidad en desfavorecer la colonización de superficies, podría pensarse que la combinación de múltiples métodos daría lugar a mejores resultados, aprovechando el funcionamiento sinérgico de dos tecnologías. Una posibilidad atractiva sería el diseño de materiales antiadherentes, que a su vez tengan capacidad de generar especies reactivas vía fotocatálisis. Este

diseño tiene la ventaja de que ambos efectos actúan por igual frente a microorganismos multirresistentes y sensibles a antimicrobianos, además de que la producción de compuestos antimicrobianos puede ser regulada por la presencia o ausencia de radiación electromagnética, disminuyendo la posibilidad de seleccionar mutantes resistentes.

1.6. Inactivación fotodinámica

En el año 1900, Oscar Raab se encontraba estudiando los efectos del colorante acridina sobre paramecios y en sus investigaciones constató que para que este colorante produzca efectos citotóxicos, la presencia de luz solar era una condición necesaria[85]. Este efecto se produjo porque la acridina actúa como fotosensibilizador (Ps). Un fotosensibilizador es una molécula que, al absorber radiación electromagnética produce un cambio químico en otra molécula[86]. La inactivación fotodinámica de microorganismos funciona a partir de la combinación de un fotosensibilizador, luz visible y oxígeno molecular para generar ROS que iniciarán la destrucción de organismos patógenos.

El fotosensibilizador posee una estructura electrónica bastante estable, con un estado singlete basal (^1Ps), que al absorber radiación electromagnética pasará a un estado singlete excitado ($^1\text{Ps}^*$) de corta vida y en algunas moléculas de Ps se dará la transición a un estado excitado triplete ($^3\text{Ps}^*$) por cruzamiento entre sistemas. Como esta última transición involucraría una modificación en la multiplicidad de spin, está prohibida por las reglas de selección de spin. Por esta razón, el tiempo de vida del $^3\text{Ps}^*$ es más largo que el $^1\text{Ps}^*$. Esto último permite que el fotosensibilizador en este estado reaccione con el oxígeno molecular para producir especies reactivas.

Existen dos mecanismos posibles para la reacción del $^3\text{Ps}^*$, denominados mecanismos de tipo I y II, los que se muestran en la figura 1.4. En el mecanismo de tipo I, $^3\text{Ps}^*$ reacciona directamente con sustratos en su entorno y con el solvente para formar especies reactivas y radicales. En el de tipo II $^3\text{Ps}^*$ transfiere energía al oxígeno molecular en su estado basal que es, inusualmente un estado triplete ($^3\text{O}_2$) para formar oxígeno singlete ($^1\text{O}_2^*$) caracterizado por ser un potente oxidante[87].

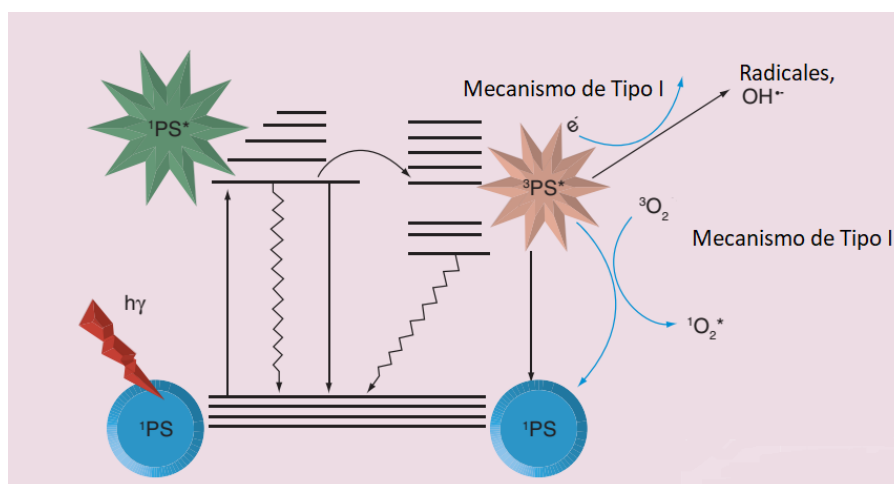


Figura 1.4: Representación de los procesos fotoquímicos en los que interviene un fotosensibilizador.

1.7. Nanotecnología y nanopartículas.

La nanotecnología es un campo de explosivo crecimiento en las últimas décadas y se basa en ingeniería y manipulación de objetos en la escala nanométrica (10^{-9} m). Es en este dominio que muchas características de los materiales se modifican, o bien que aparecen características que en escala macroscópica estaban ausentes. El surgimiento de nuevas características al llegar a la escala nanométrica está asociado a diversos fenómenos como, por ejemplo, el efecto de confinamiento cuántico, que da cuenta de la modificación dependiente del tamaño de las propiedades ópticas y electrónicas de nanomateriales[88].

Las nanopartículas, materiales cuyas tres dimensiones espaciales son menores que 100 nm, han sido utilizadas en diversos ámbitos, tales como la medicina, la industria alimenticia y la generación de energías renovables, entre otros[89, 90, 91, 92, 93, 94]. Una subcategoría de estas nanopartículas que resulta particularmente interesante son aquellas constituidas por materiales semiconductores. Estas nanopartículas suelen denominarse “quantum dots” (QD) cuando sufren efectos de confinamiento cuántico en sus propiedades fotofísicas. Este tipo de partículas se destacan por poseer buenas capacidades de fotocátalisis y fotoluminiscencia [95, 96] regulables por tamaño.

1.8. Nanomateriales de Silicio

Como se planteó en la sección anterior, los QD de materiales semiconductores poseen interesantes características relacionadas con su interacción con la radiación electromagnética producto del efecto de confinamiento cuántico. Este efecto también se observa en nanopartículas de silicio de tamaños entre 1-5nm (SiQD) que, en consecuencia y a diferencia del silicio semiconductor en fase masiva, muestran intensa fotoluminiscencia a temperatura ambiente [97]. A las capacidades mencionadas de estas partículas se agregan las propiedades particulares del silicio, entre las que se destaca su baja citotoxicidad, sobre todo si se las compara con QD de metales pesados como Se y Cd[98, 99], de hecho se ha publicado que los SiQD son metabolizados y expulsados del organismo por excreción renal[100].

La interacción de los QD con la radiación electromagnética puede ser entendida a partir de interpretar los cambios que ejerce el efecto de confinamiento cuántico en su estructura electrónica. Al absorber un fotón, el QD accederá a un estado excitado, donde un electrón alcanzará la banda de conducción y dejará un hueco en la banda de valencia, con el que se encontrará vinculado por interacción coulombiana. Como este par presenta analogías a la estructura de átomos hidrogenoides se puede definir un radio de Bohr r_B . Esta medida para el Silicio es de 4.5nm y representa la frontera de tamaño a partir de la cual se dan efectos relacionados con el confinamiento cuántico[101]. La estructura electrónica de nanopartículas entre 1-5 nm de tamaño puede pensarse como un intermedio entre los niveles electrónicos discretos de las moléculas y las bandas de conducción y valencia de los sólidos macroscópicos (figura 1.5).

Una propiedad muy importante de los SiQD en el contexto de salud es su capacidad de generación fotosensibilizada de O_2^- y 1O_2 [103, 104, 105], que sumado a su baja toxicidad los hace una excelente herramienta para la inactivación fotodinámica de microorganismos.

1.9. Efecto de PEG

El Polietilenglicol (PEG) es un polímero, cuya estructura química puede representarse como $HO-(CH_2-CH_2-O)_n-H$, siendo n el número de repeticiones de las subunidades entre paréntesis.

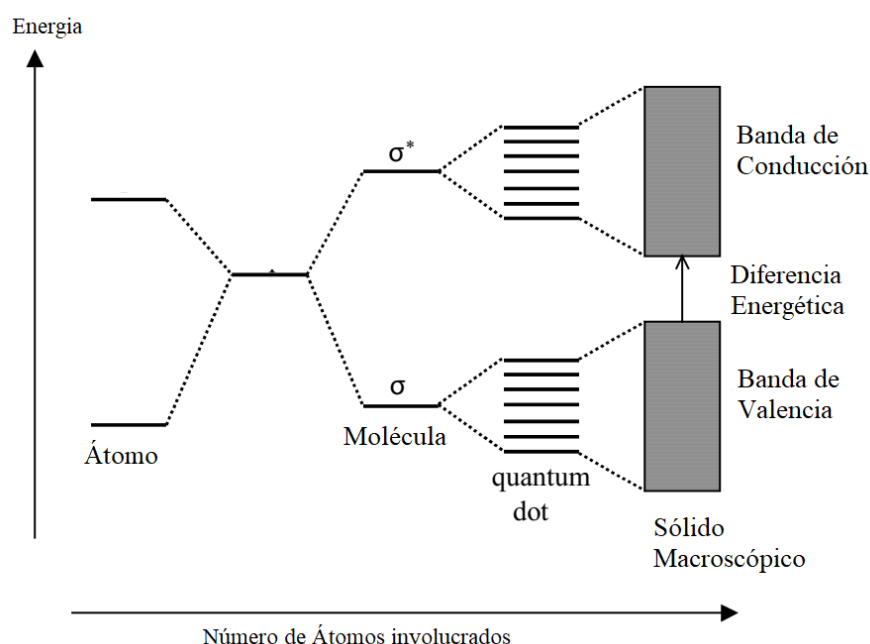


Figura 1.5: Representación gráfica de la transición de estructura electrónica desde un átomo hasta un sólido macroscópico. Adaptada de [102].

Existen por tanto, distintas variaciones de esta sustancia y se clasifican según su peso molecular en Da (Dalton), léase PEG600, PEG800, etc. Es una sustancia bastante soluble en agua, es poco inflamable, es biodegradable y la FDA¹ la ha calificado como GRAS (Generally Regarded As Safe, generalmente considerada como segura) y la ha considerado apta para el consumo interno [106].

En el contexto de este trabajo resulta interesante su capacidad reportada como recubrimiento de superficies ya que se ha reportado que superficies recubiertas con PEG disminuyen notablemente la adhesión de proteínas [107], dificultando entonces la formación de películas acondicionantes que luego permitirían la formación de biopelículas.

Adicionalmente se ha reportado la capacidad de inhibir o disminuir la formación de biofilms de variadas especies bacterianas sobre superficies de variados materiales (acero inoxidable, poliestireno, esmalte dental, etc) con coberturas de PEG [108, 109, 110, 111].

El PEG también es utilizado en el diseño de nanopartículas en nanotecnología aplicada a la salud, ya que este polímero genera un efecto de inhibición estérica a la adsorción de proteínas. Como consecuencia de ello, disminuye el reconocimiento de estas partículas por macrófagos y por ende la respuesta inmune del organismo, aumentando el tiempo de residencia en sangre de las nanopartículas. Este último punto resulta de interés cuando se necesita que el nanomaterial llegue a una región específica del organismo, como podría ser un tumor [112, 113, 114].

¹ Food and Drug Administration agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos, medicamentos, cosméticos, aparatos médicos, productos biológicos y derivados sanguíneos

1.10. Hipótesis y objetivos

Este trabajo de tesina se realizó bajo la siguiente hipótesis: “*Los films nanoestructurados conteniendo nanopartículas de Si semiconductor y biopolímeros son capaces de inhibir la formación de biofilms bacterianos.*”

Para poder evaluar esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos

- Sintetizar nanopartículas de silicio recubiertas con PEG (NPSiPEG) siguiendo protocolos optimizados en el grupo de trabajo.
- Desarrollar estrategias de generación de films (FilSiQD-PEG) de SiO₂ con NPSiPEG embebidas mediante técnicas de sol-gel.
- Evaluar el grado de adhesión de *S. aureus* sobre la superficie y la eventual acción antimicrobiana de los films obtenidos.
- Evaluar el efecto de la irradiación UV sobre la adhesión de *S. aureus* sobre la superficie y la eventual acción antimicrobiana de los films obtenidos

CAPÍTULO

2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Gases, solventes y reactivos

Reactivo	Fórmula	Pureza (%)	Marca
Etanol	C ₂ H ₅ OH	96	Purocol
N,N-dimetilformamida	C ₃ H ₇ NO	>99	J.T Baker

Tabla 2.1: Solventes utilizados

Reactivo	Fórmula	Pureza (%)	Marca
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	95-98	Cicarelli
Ácido Nítrico	HNO ₃	65	Cicarelli
Tetraetil Ortosilicato	SiC ₈ H ₂ O ₄	99	Merck
Cloruro de Amonio	NH ₄ Cl	99.5	Carlo Erba
Siliciuro de Magnesio	Mg ₂ Si	> 95	Sigma Aldrich
Polietilenglicol 600	H(C ₂ H ₄ O)nOH	98	Merck
Agar	—	—	Sigma Aldrich

Tabla 2.2: Reactivos utilizados

Además, se utilizó el gas Argón (Calidad 4 bandas).

2.2. Medios de Cultivo bacteriano

2.2.1. Agar Nutritivo Britania

Composición	Concentración (g/l)
Pluripeptona	5
Extracto de Carne	3
NaCl	8
Agar	15

2.2.2. Caldo Nutritivo Britania

Composición	Concentración (g/l)
Pluripeptona	5
Extracto de Carne	3

2.3. Técnicas de Sol-Gel

Las técnicas de sol-gel representan una alternativa muy interesante para la formación de geles de sílice, ya que permiten formar films de diversos materiales de una forma muy sencilla y permitiendo un gran

control sobre el producto final. Este proceso funciona mediante la formación de suspensiones coloidales a partir de monómeros (sol), que luego se integran para formar redes poliméricas (gel).

Para los fines de este trabajo se decidió utilizar una técnica sol-gel basada en el proceso Polietilenglicol sol (PEGS)[115], que consiste en la hidrólisis, deshidratación y condensación de TEOS (como se muestra en la figura 2.1), catalizada por HNO_3 en medio etanol sobre un vidrio portaobjetos; al evaporarse el etanol, se deposita la red de sílice formada sobre el vidrio. La inclusión de SiQDs en la mezcla hace que estos queden embebidos en la red.

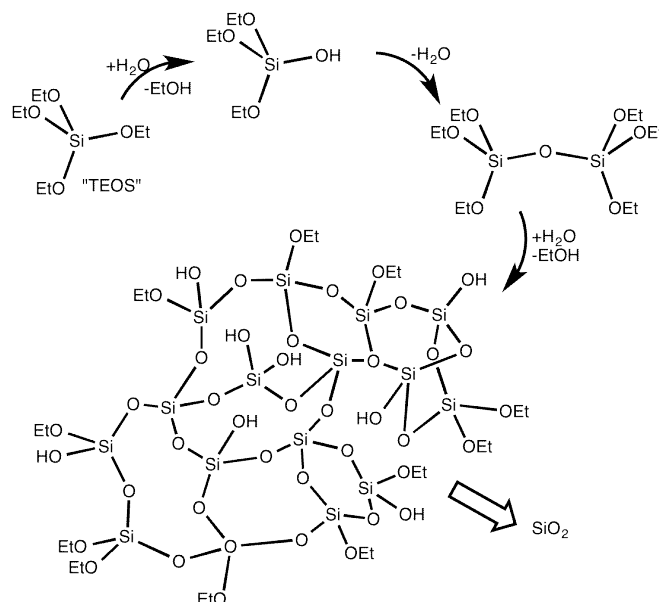


Figura 2.1: Representación gráfica de la hidrólisis, deshidratación y condensación de TEOS

2.4. Material y equipamiento de uso frecuente en el Laboratorio

Las pesadas se realizaron mediante una balanza electrónica marca A&D modelo ER-182A de $\pm 0.1 \text{ mg}$ de precisión. Se utilizó un equipo de ultrasonidos marca TESLAB S.R.L. Modelo TB04TA con una potencia de 160W y una frecuencia de 40 kHz para asegurar la dispersión de los nanomateriales en suspensión. En los procesos de purificación se emplearon filtros de membrana hidrofílica con poros de 100 nm, VVPP, Durapore® y membranas de diálisis de 20.4 mm de diámetro MWCO 6000-8000, Spectra/por®. Los cambios de solventes pertinentes se llevaron a cabo mediante un rotavapor Senco, con trampa de nitrógeno líquido. Para realizar los estudios microbiológicos se empleó un flujo laminar horizontal marca FILTRAR y un autoclave eléctrico SanoClav

2.5. ATR-FTIR

La absorción de radiación infrarroja en una sustancia determinada genera un cambio en el modo vibracional de sus grupos funcionales, cuando la frecuencia de oscilación de la radiación incidente coincide con la frecuencia de resonancia natural de dicho grupo funcional para un modo vibracional determinado, siempre y cuando se produzca un cambio en momento dipolar y haya una variación singular en el número cuántico vibracional (Figura 2.2). Como la frecuencia de resonancia natural de un grupo funcional queda establecida por las características fisicoquímicas de éste (y de su entorno), la colección de un espectro que abarque un rango amplio de radiaciones IR nos permitiría obtener la "huella digital" de una determinada

sustancia. De hecho, la espectroscopia infrarroja es tremendamente útil en la caracterización cualitativa de sustancias.

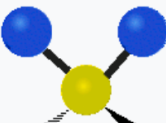
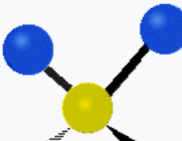


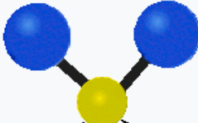
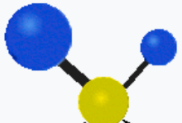
Symmetry Direction	Symmetric	Antisymmetric
Radial	 Symmetric stretching	 Antisymmetric stretching
Latitudinal	 Scissoring	 Rocking
Longitudinal	 Wagging	 Twisting

Figura 2.2: Modos Vibracionales representados en una molécula de metano.

Existen distintas maneras para obtener espectros en el infrarrojo, espectroscopía IR de transmisión, reflexión y emisión [116].

Para el interés de este trabajo resulta importante hablar de la espectroscopía IR por reflexión. Cuando una onda EM pasa de un medio (m_1) de menor a otro medio (m_2) de mayor índice de refracción, esta es reflejada; a medida que el ángulo de incidencia de la onda con la interfaz entre m_1 y m_2 (θ) aumenta, también aumenta la fracción de radiación reflejada hasta llegar a un valor crítico (θ_c), a partir del cual la reflexión es total. Aún en condiciones de reflexión total una pequeña fracción de la radiación penetra una corta distancia en m_2 , la onda penetrante se denomina *onda evanescente*. Si m_2 absorbe algunas longitudes de onda de la onda evanescente, se dará la atenuación de la esta, o sea la *reflexión total atenuada* (ATR).

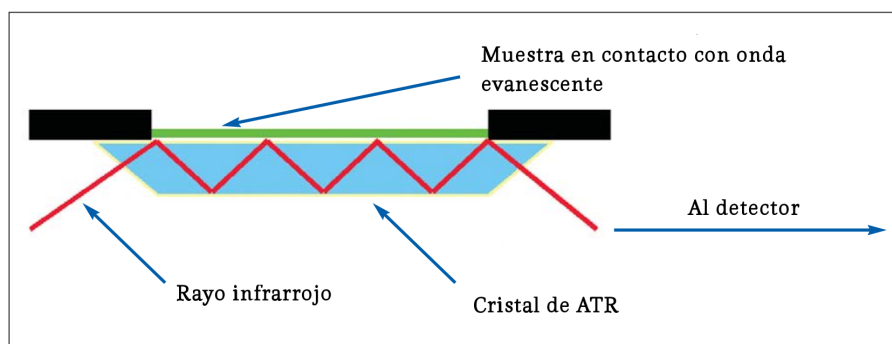


Figura 2.3: Diseño de celda de ATR-FTIR

Un equipo de espectroscopía ATR-FTIR funciona bajo los principios mostrados en la figura 2.3; una fuente produce radiación IR que es reflejada entre el cristal de ATR (análogo a m_1) y la muestra (análogo

a m_2) en múltiples puntos. Posteriormente la radiación atenuada arriba al detector. Como la distancia de penetración de la onda evanescente es pequeña (habitualmente entre 0.5 y 2 μm), los compuestos que podrán absorber la radiación serán aquéllos ubicados en la superficie de la muestra; esto hace que la técnica ATR-FTIR sea extraordinariamente útil a la hora de caracterizar superficies.

Las medidas para este trabajo de tesina fueron realizadas con un espectrómetro FTIR Agilent Cary 630 con un accesorio ATR Single Bounce que posee un cristal de diamante.



Figura 2.4: Espectrómetro FTIR Agilent Cary 630 con accesorio ATR Single Bounce.

2.6. Espectroscopía de absorción UV-Visible

La absorción de radiación electromagnética es el proceso en el cual la materia toma energía por interacción con un fotón. Este fenómeno puede ser entendido a partir de variables macroscópicas por medio de la ley de Lambert-Beer, cuyas posibles expresiones se condensan en la ecuación 2.1:

$$A(\lambda_{exc}) = -\log T(\lambda_{exc}) = -\log \left[\frac{I_T(\lambda_{exc})}{I_0(\lambda_{exc})} \right] = \varepsilon(\lambda_{exc})lc \quad (2.1)$$

Donde A es la absorbancia de la muestra, que se vincula de forma logarítmica con la transmitancia T . Esta se define como el cociente entre la intensidad transmitida por la muestra (I_T) y la intensidad incidente (I_0). A su vez, la absorbancia se define alternativamente como el producto entre el camino óptico (l), el coeficiente de absorción molar (ε) y la concentración molar (C) de la especie absorbente. Puede verse en 2.1 que las variables dependen de la longitud de onda de excitación λ_{exc} .

Las medidas de Absorbancia se hicieron con un espectrómetro UV/Visible PG Instruments T90+.

Para hacer las medidas de absorción de vidrios modificados se utilizó un soporte de films como el que se muestra en la figura 2.5 (instalado en el equipo).

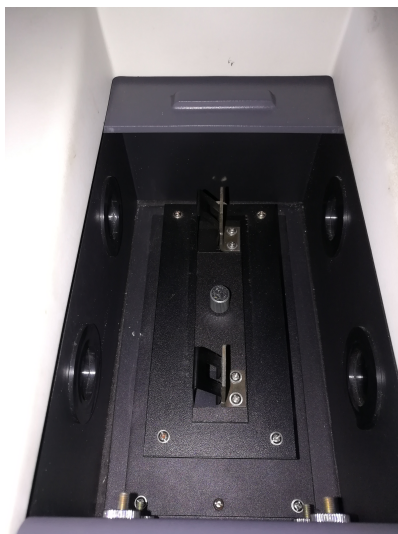


Figura 2.5: Soporte para films del espectrofotómetro PG T90+

2.6.1. Utilización de esfera integradora

Cuando se hacen medidas de absorción de suspensiones, se produce un efecto de dispersión de luz. La fracción de luz dispersada no llega al detector y por tanto el equipo la considera como absorción de la muestra, lo que da lugar a una distorsión en el espectro final. Debido a que los QD que se utilizaron en este trabajo de tesina dispersan luz en el intervalo del espectro EM en el cual se desea medir absorción se realizaron las medidas utilizando una esfera integradora.

Normalmente se puede hablar de dos tipos distintos de dispersión cuando se hacen medidas de absorción, denominadas *back* y *forward scattering*. En el primer caso la luz es dispersada en forma de reflejo formando un cono de 180° en el frente de la muestra. En el caso del forward scattering la muestra es dispersada formando un cono de 180° por detrás de la muestra, este tipo de dispersión esta relacionada por las características difusas de la muestra. Las muestras utilizadas en ese trabajo de tesina presentan este tipo de dispersión.

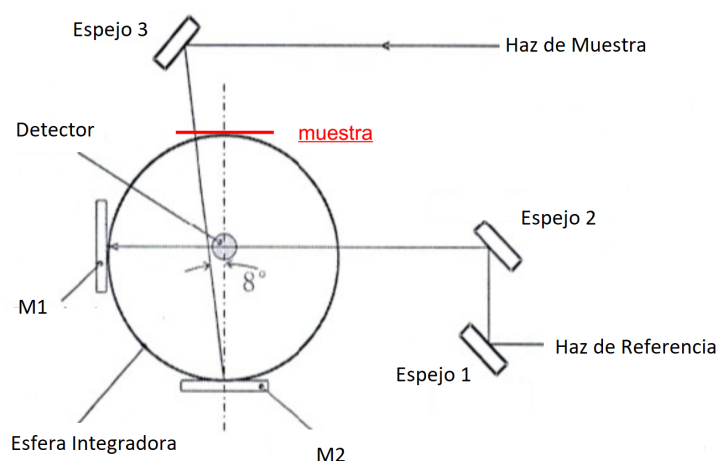


Figura 2.6: Esquema de la esfera integradora.

Como se observa en la figura 2.6 el haz de muestra atraviesa la muestra, que absorberá una fracción de la radiación recibida; la radiación dispersada por la muestra ingresará en la esfera integradora, que esta

construida con un material altamente reflectivo. Una vez dentro de la esfera, la luz será reflejada múltiples veces por las paredes de la esfera, hasta ser colectada “integrada” en el detector, ubicado en el centro. Cuando se realizan medidas, los puertos M1 y M2 han sido cubiertos con BaSO₄, un material altamente reflectivo. Ambos puertos serán el primer punto de reflexión de los haces de referencia y muestra respectivamente.

Antes de realizar las medidas se deben hacer las calibraciones pertinentes, éstas son la corrección por corriente oscura (0 %T) y la línea de base. Para el primer caso se reemplaza el BaSO₄ de M2 por un cuerpo oscuro (provisto con el equipo) la presencia del cuerpo oscuro en M2 hará que el haz de muestra no sea reflejado dentro de la esfera y no haya colección de luz en el detector. Por otro lado para medir la línea de base se colocará un blanco (en el caso de las medidas realizadas el blanco fue agua) en la posición de la muestra y se coloca BaSO₄ en las posiciones M1 y M2, en este caso para permitir la reflexión de luz dentro de la esfera.

2.7. Determinaciones de producción de ¹O₂

Para las determinaciones de producción de oxígeno singlete se usó la sonda molecular Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG)[®] de Thermo Fischer Scientific. Esta sonda está compuesta por un donante de electrones (derivado de antraceno) y un aceptor (derivado de fluoresceína) unidos covalentemente [117]. En presencia de ¹O₂, SOSG[®] emite fluorescencia verde con máximos de excitación y emisión a 504 y 525 nm, respectivamente.

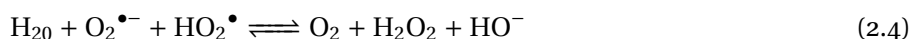
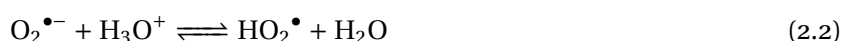
La emisión de esta fluorescencia verde corresponde a la formación de un endoperóxido generado por la interacción del ¹O₂ con el residuo de antraceno del SOSG[®], como se observa para otras sondas fluoresceína - antraceno similares, tales como DMAX o DPAX [118].

Para realizar las medidas se resuspende un vial del reactivo comercial (100 µg SOSG[®]) en 33 µL de metanol y se añaden luego 297 µL de agua mQ. De esta solución madre se toman 3 µL por cada 1447 µL de H₂O_{mQ} y se vierten en una celda de vidrio o cuarzo, de forma tal de tener una concentración 50 µM de la sonda. Luego se agregará a la celda el vidrio correspondiente a la muestra a medir.

Las muestras fueron irradiadas con una lámpara UV de 350 nm a diferentes tiempos. Se toma luego el espectro de emisión a 525 nm y excitación 461 nm con el fluorómetro descrito en la sección 2.10.

2.8. Determinaciones de producción de O₂^{-•}

La generación de superóxido se determinó de forma indirecta mediante la detección de agua oxigenada (H₂O₂) producida a partir de las ecuaciones 2.2, 2.3 y 2.4.



La concentración de H₂O₂ en las muestras de reacción se midió mediante un método enzimático colorimétrico empleando un kit comercial de Wiener para determinación de colesterol [119]. El kit comercial provee una solución conteniendo colesterol esterasa (CHE), colesterol oxidasa (CHOD), peroxidasa (POD), 4-aminofenazona (4-AF) y buffer Good, conteniendo fenol y colato de sodio. El método se basa en la reacción del H₂O₂ con una mezcla de 4-AF y fenol para dar como producto la quinonaimina (4-(p-benzoquinona monoimino)-fenazona) que presenta un máximo de absorbancia a 505 nm ($\epsilon(505) = 5035 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [120].

La reacción catalizada por la POD se muestra a continuación:

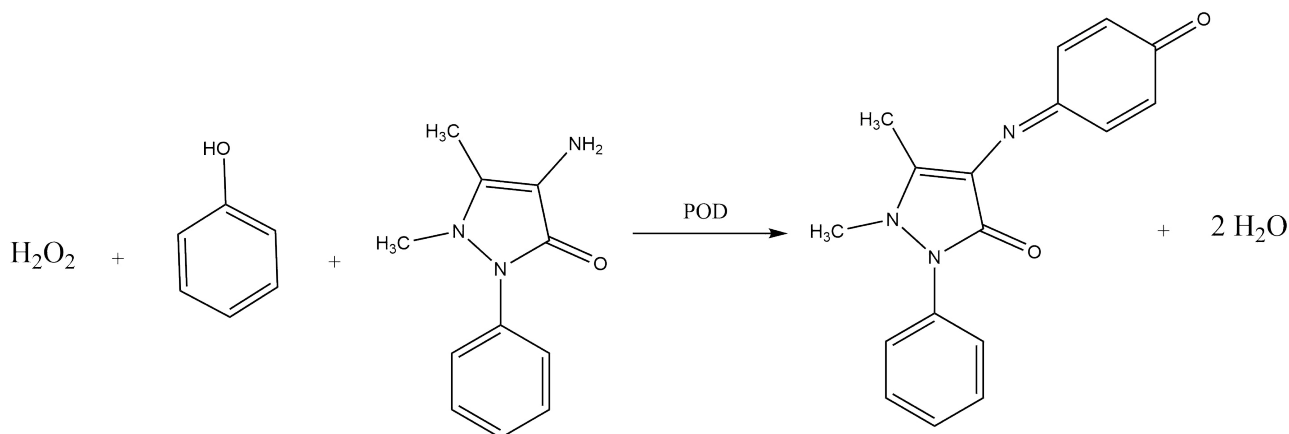


Figura 2.7: Reacción catalizada por la enzima peroxidasa

Es importante aclarar que las enzimas Lipasa y CHOD intervienen solamente en la secuencia de reacciones que involucra la determinación del colesterol, no afectando la determinación de H_2O_2 .

Se preparan diluciones a partir H_2O_2 comercial de 30 volúmenes dentro del rango como se muestra en las tablas 2.8 y 2.9.

Solución	μL de H_2O_2 para 10.0 ml de solución
SC1	5
SC2	10
SC3	20
SC4	40

Figura 2.8: Soluciones de H_2O_2

Solución	Volumen para 10.0 ml de solución	Concentración H_2O_2
SCA	200 μL de SC1	98 μM
SCB	200 μL de SC2	196 μM
SCC	200 μL de SC3	392 μM
SCD	200 μL de SC4	784 μM

Figura 2.9: Diluciones de soluciones SC1-4

Un volumen de 400 μL de las diferentes diluciones y de un blanco de agua destilada se mezclan con 1.8 ml del reactivo comercial. Las diferentes diluciones y el blanco se incuban durante 5 minutos a 37°C (o durante 30 minutos a temperatura ambiente). Transcurrido el tiempo de incubación se mide la Abs_{505} . Se arma la curva de calibración y se procede luego a la determinación de las muestras. Éstas se irradian durante 30 min con una lámpara de 350 nm. Luego se agrega un volumen de 400 μL de cada muestra sobre 1.8 ml del reactivo y se incuba durante 5 minutos a 37°C . Se realiza la lectura de absorbancia a 505 nm y de la curva de calibración (Figura 2.10) se obtienen los valores de concentración de H_2O_2 .

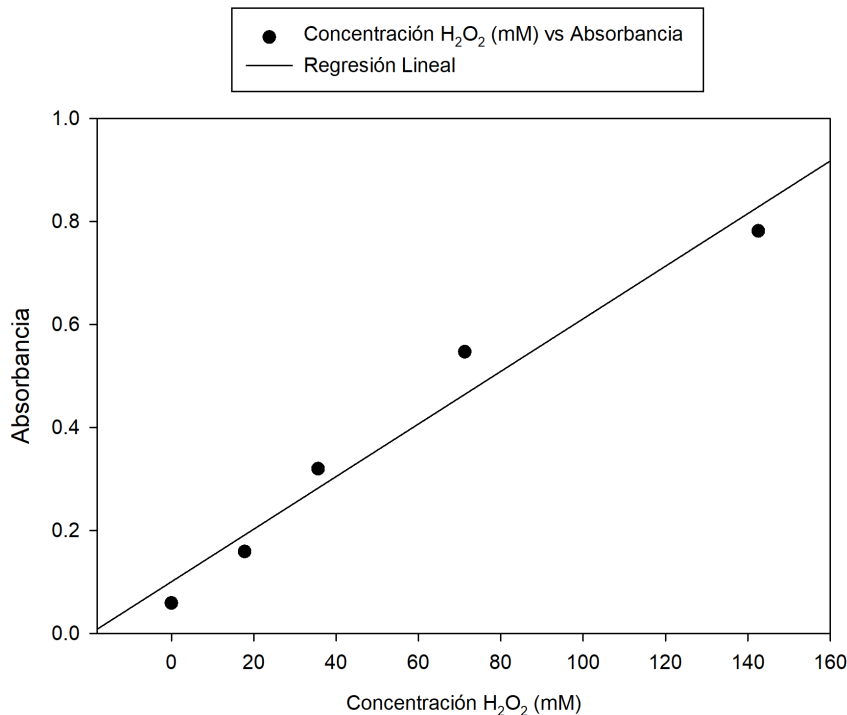


Figura 2.10: Curva de Calibración $[H_2O_2]$ vs Absorbancia

2.9. Formación de Films Finos por Dip Coating

La técnica de Dip Coating, o Recubrimiento por inmersión es comúnmente utilizada en la formación de películas sólidas finas sobre distintos tipos de sustratos sólidos mediante la inmersión de estos sustratos en soluciones o suspensiones líquidas de los materiales de recubrimiento. Esta técnica consiste en cinco pasos relativamente sencillos[121] que se muestran en la figura 2.11:

1. **Inmersión:** Al sumergir el sustrato se produce el arrastre de los gases que lo cubren y son remplazados por el líquido. Según la velocidad a la que se realice este paso, pueden quedar burbujas de gas en la superficie, que empeorarán el recubrimiento.
2. **Comienzo de Retirada:** Luego de permanecer en el líquido un cierto tiempo, comienza a retirarse el sustrato a velocidad constante.
3. **Deposición y drenado:** Al retirarse el sustrato de la fase líquida comienza la retirada del líquido desde el extremo superior del sustrato, formando un menisco de forma convexa. Las fuerzas de tensión superficial ejercidas por debajo del menisco generan una presión sobre el líquido, causando que este drene hacia abajo y que se deponga una fina capa de sólido en el borde. Producto de la acción de fuerzas viscosas más “abajo” en el film la velocidad de drenaje baja, dando lugar a un film más grueso a medida que se recorre el sustrato.
4. **Drenado:** El exceso de líquido drena de la superficie.
5. **Secado:** El solvente se evapora para dejar el sólido formado. Este paso no debe hacerse de forma demasiado rápida, ya que un secado brusco puede dar lugar a la formación de una “cáscara” sólida que ralentice el proceso de secado.

Un punto importante para considerar es que la repetición de estos pasos generará una superficie con muy buena cobertura del sustrato, debido a la deposición sucesiva de nuevas capas de sólido.

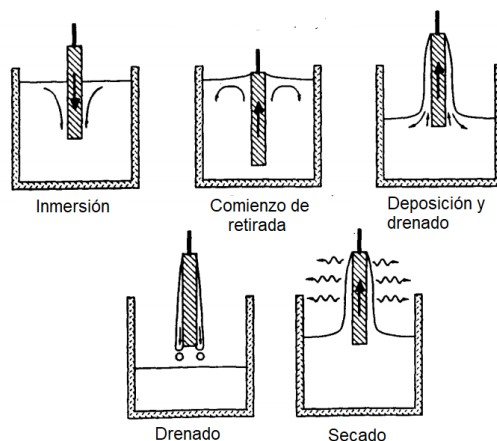


Figura 2.11: Representación gráfica de las distintas etapas del proceso de Dip Coating, adaptado de [121]

2.10. Medidas de Fluorescencia

Los espectros de excitación y emisión a temperatura ambiente se obtuvieron mediante un equipo JOBIN-YVON SPEX FLUOROLOG FL3-11.



Figura 2.12: Fluorómetro SpexFluorolog FL3-11 Horriba - JovinYvon.

El fluorómetro se muestra en la figura 2.12. Siempre se emplearon celdas de cuarzo con camino óptico de 10 mm. Se utilizó un paso de longitud de onda de barrido 1 nm y un tiempo de integración en cada paso de 0,3 seg. Para la excitación se usó una lámpara de Xe de presión media acoplada a un monocromador con 1 nm de paso de banda. Luego de la excitación de la muestra, la emisión se detecta a 90 grados y se dirige a un monocromador de doble red con paso de banda 1 nm. La detección se realizó mediante un detector R928 PM (Hamamatsu). La señal adquirida fue corregida por la distribución espectral de la lámpara y el detector.

2.11. Laser Flash Fotólisis

La técnica de Laser Flash fotólisis es de gran utilidad en la elucidación de mecanismos de reacción para procesos fotoquímicos complejos.

Esta metodología permite dilucidar las etapas elementales en un proceso fotoquímico mediante la irradiación de una determinada muestra con un pulso de luz de alta intensidad y corta duración, que generará

una producción de relativamente altas concentraciones de intermediarios de reacción y el posterior seguimiento de los productos formados como consecuencia de la irradiación, con una técnica suplementaria.

Para el proceso de excitación se utilizan láseres, capaces de producir pulsos de luz con las características deseadas, el pulso debe ser corto porque la duración de éste determinará cuáles procesos químicos pueden ser estudiados, en base a la duración de éstos.

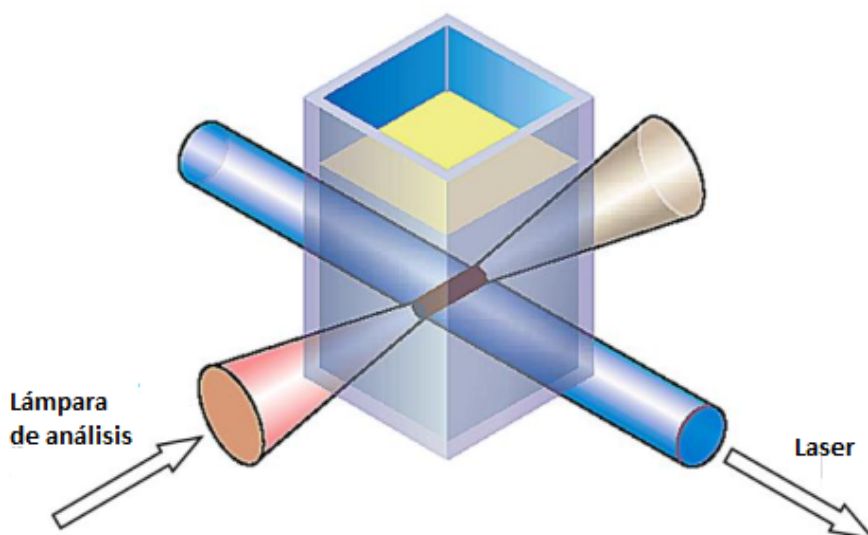


Figura 2.13: Esquema de la disposición de haces.

Un criterio importante para seleccionar la técnica de monitoreo es que ésta tiene que poder responder rápidamente ante los cambios de concentración de las especies generadas. La espectroscopía de absorción es una técnica comúnmente utilizada, un diseño experimental bastante utilizado consiste en disponer al haz de fotólisis y al de análisis formando un ángulo recto. La producción de especies transientes y su subsecuente monitoreo ocurrirá solo en el área en donde ambos haces se solapan.

El haz de análisis proviene de una lámpara, pasa a través de la celda de reacción y luego incide en la rendija de entrada de un monocromador. Por medio de un tubo fotomultiplicador se detecta la luz correspondiente a la longitud de onda seleccionada en el monocromador. La misma se elige teniendo en cuenta el espectro de absorción de la especie que se desea medir. Parte de la luz de esta longitud de onda es absorbida por los radicales generados en la fotólisis, de manera que la señal generada por el fotomultiplicador disminuirá a partir del pulso de fotólisis y luego retomará su nivel inicial a medida que los radicales reaccionen. Es decir, la señal de absorción del radical aumentará instantáneamente debido a su generación por el pulso de fotólisis, y luego decaerá de acuerdo a cómo reaccione este radical.

La corriente generada en el fotomultiplicador, proporcional al cambio en la intensidad de luz, se convierte en voltaje. Este último se mide con un osciloscopio que registra la señal en una serie de intervalos de tiempo y la almacena en forma digital. Luego los datos pueden ser archivados en una computadora, donde serán analizados.

Las medidas de este trabajo de tesina se hicieron usando un láser Nd:YAG Continuum Surelite II y un espectrómetro Edinburgh Instruments LP980. Se utilizaron soluciones de concentración 0.05M.

2.12. Estudio de superficies mediante microscopía de epifluorescencia

Para la caracterización de las superficies modificada con QD's y estudios de colonización, se utilizó un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51 con filtros tipo #WB correspondientes a: espejo dicróico DM460, filtro de excitación BP350 y barrera de filtro BA400. BP (band pass filter): filtros que dejan pasar una banda comprendida entre dos longitudes de onda, por ejemplo "BP460-580" significa que es opaco a longitudes de onda no comprendidas entre 460nm y 580nm. En la figura 2.14 se presenta una fotografía del microscopio utilizado.



Figura 2.14: Microscopio de epifluorescencia Olympus BX51.

2.13. Medida de Ángulo de contacto

Cuando un volumen de líquido se pone en contacto con un sustrato sólido, las fuerzas de capilaridad inducen movimiento de la línea de contacto pudiendo producir un film (mojabilidad total) o una gota con un ángulo de contacto finito (condición de mojabilidad parcial)[122]. El análisis de la forma de una gota es uno de los más simples y eficientes técnicas para estudiar los fenómenos de mojabilidad. Los ángulos de contacto nos proporcionan valiosa información sobre los sustratos y puede ser predicha si se aproxima a superficies ideales por la ecuación de Young.

$$\gamma_{LV} \cos \theta_Y = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (2.5)$$

Donde γ_{LV} es la tensión interfacial líquido-vapor (mJ/m²) (agua a 293 K = 72,8 J [8]) γ_{SV} es la tensión interfacial sólido-vapor; γ_{SL} es la tensión interfacial sólido-líquido; θ_Y es el ángulo de contacto medido en la fase líquida. Un ángulo de contacto pequeño (< 90°) indica que la mojabilidad es muy alta, y el fluido se extenderá sobre la superficie; ángulos de contacto grandes (> 90°) significan que la mojabilidad es baja y el fluido disminuirá el contacto con la superficie, formando una gota compacta. En el caso del agua, una superficie en la cual la mojabilidad sea alta se denomina hidrofílica (figura 2.15C), y en caso contrario, hidrofóbica (figura 2.15B). Las superficies muy hidrofóbicas presentan ángulos de contacto mayores a 150°, produciéndose un escaso contacto entre la gota líquida y la superficie (figura 2.15A).

Para evaluar los cambios en la mojabilidad de las superficies generadas se realizaron medidas del ángulo de contacto de una gota de agua con la superficie. Dichas medidas fueron realizadas con un goniómetro ramé-hart Modelo 500 (ramé-hart instrument co., USA) que utiliza el Software ImageJ para analizar las imágenes. Los experimentos fueron realizados en atmósfera de aire y a temperatura ambiente. El equipo consta

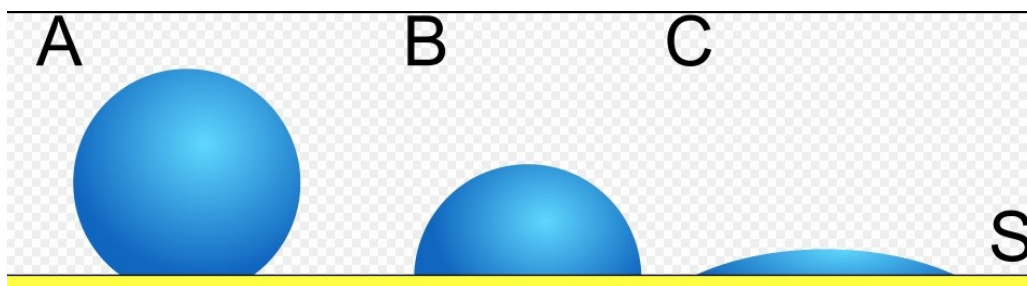


Figura 2.15: Mojabilidad de diferentes fluidos. El fluido A posee una mojabilidad muy pequeña y un ángulo de contacto muy grande (ángulo obtuso), mientras que la mojabilidad del C es muy grande y su ángulo de contacto muy pequeño (ángulo agudo).

de una superficie donde se deposita la muestra, una aguja perpendicular a este plano que deposita una gota que es iluminada por una lámpara para obtener una buena imagen y una cámara fotográfica alineada a 90° con la superficie donde se deposita la gota. El ángulo que forma la gota con la superficie una vez depositada se determina a partir de la fotografía que realiza la cámara. En la figura 2.16 se presenta una foto de la maquinaria empleada.

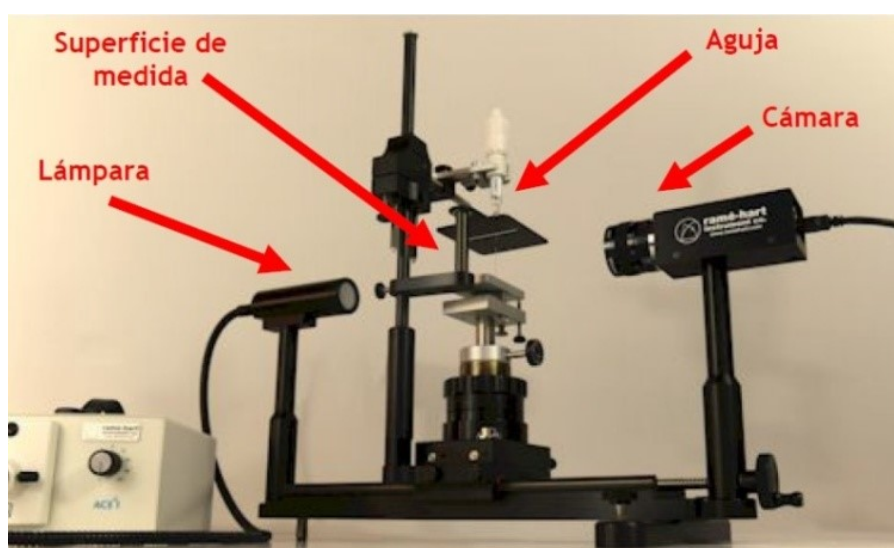


Figura 2.16: Gonómetro ramé-hart Modelo 500.

2.14. Metodologías aplicadas a ensayos microbiológicos

Antes de comenzar la descripción de las técnicas utilizadas en los ensayos microbiológicos, vale aclarar que los materiales empleados, cuando resultó pertinente, fueron esterilizados utilizando una autoclave SanoClav (mencionado en la sección 2.4), calentando durante 20 minutos a 121°C .

2.14.1. Preparación del Inóculo

Para los ensayos de colonización bacteriana, se colocaron 100 ml de caldo de cultivo estéril en un erlenmeyer estéril. Posteriormente se inoculó con una anzada de la cepa de *S. aureus* ATCC 25923. Seguidamente,

se colocó el erlenmeyer en un cuarto estufa a 31 °C durante toda la noche bajo agitación, hasta llegar a una $DO_{590} = 4$.

Posteriormente se realizaron dos diluciones seriadas del inóculo inicial, según lo especificado en las figuras 2.3 y 2.4. La dilución resultante constituye el inóculo para los ensayos biológicos.

Sustancia	Volumen (μL)
Cultivo <i>S. aureus</i>	100
Agua destilada	900

Tabla 2.3: Dilución 1

Sustancia	Volumen (μL)
Caldo de Cultivo	200
Dilución 1	50
Agua destilada	750

Tabla 2.4: Dilución 2

2.14.2. Inoculación de vidrios modificados

Para poder desarrollar los ensayos de inactivación fotodinámica se dispusieron, en condiciones de esterilidad, los distintos vidrios modificados y sin modificar en una placa de Petri estéril. Luego se depositó una gota de 20μL de inóculo, como se describe en la figura 2.17.

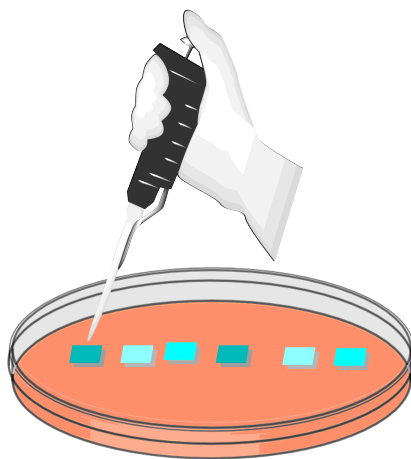


Figura 2.17: Inoculación de vidrios modificados

2.14.3. Ensayos de inactivación fotodinámica

Se realizaron dos ensayos (A y B) para evaluar la capacidad de FilSiQD-PEG como agente de inactivación fotodinámica contra biofilms de *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 en distintas etapas de su desarrollo temprano.

En Ensayo A se evaluó el efecto de FilSiQD-PEG sobre la colonización bacteriana de la superficie de vidrio que ocurría simultáneamente con la irradiación de los vidrios. Con ese propósito, se inocularon los vidrios y se separaron en dos placas de Petri, una de las cuales fue cubierta con papel aluminio. Luego ambas placas

fueron irradiadas por dos horas. Por último, se procedió a hacer el conteo de bacterias adheridas al vidrio como se detalla en la sección 2.14.5.

En el caso del Ensayo B, después de inocular los vidrios, se incubaron en estufa por 2 h para formar un biofilm temprano. Luego, en un gabinete de flujo laminar, se lavaron los vidrios 2 veces con agua destilada estéril en placas de Petri estériles para eliminar excesos de inóculo que no hubieran formado biofilms. Paralelamente se llenaron 6 pocillos de una placa multiwell estéril de 24 pocillos con 100 µL de caldo de cultivo estéril y 1900 µL de agua destilada estéril. Seguidamente se introdujeron los vidrios en sendos pocillos y el conjunto se introdujo bajo la lámpara de irradiación. Una vez encendida la lámpara se destapó la placa y se cubrió la mitad de los pocillos con papel de aluminio y se dejó irradiar por dos horas. Por último, al finalizar la irradiación, se procedió a contar las bacterias adheridas tal como se indica en la sección 2.14.5. Ambos ensayos fueron realizados por triplicado.

2.14.4. Irradiación de vidrios modificados

El paso de irradiación para ambos ensayos (A y B) fue desarrollado con una lámpara de tubo con su emisión centrada en 350 nm que se dispuesta a 4 cm de las distintas muestras, como se muestra en las figura 2.18. Cabe aclarar que la irradiación se realizó en un compartimiento oscuro para asegurar la ausencia de otras fuentes luminosas.

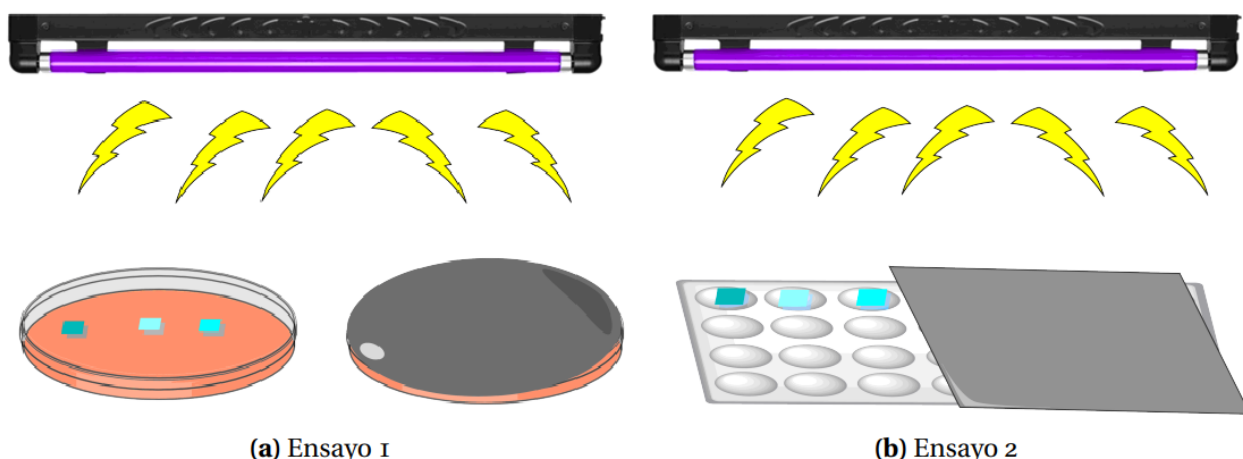


Figura 2.18: Esquema de irradiación de placas. Se representan el Ensayo A (izquierda) con dos placas de Petri una de las cuales está cubierta con papel de aluminio y Ensayo B (derecha) con la mitad de los pocillos cubiertos por papel de aluminio.

En ambos ensayos se utilizaron 2 vidrios de cada tipo, para que mitad de los vidrios puedan ser utilizados como controles sin irradiación. Sin embargo, como resulta importante que todo el resto de las condiciones se mantengan iguales para todos los vidrios, los controles en oscuridad fueron ubicados bajo la lámpara junto a los irradiados, pero los primeros fueron cubiertos con papel aluminio tal como se muestra en la figura 2.18.

2.14.5. Recuento de Unidades Formadoras de Colonia(UFC)

Transcurrido el tiempo de irradiación (2 h) , se retiraron los vidrios con una pinza, y se los enjuagó dos veces con agua estéril. Se depositó cada sustrato en un tubo de ensayo con un mililitro de agua estéril en su interior. A cada tubo se lo colocó en el sonicador y se lo sonicó por 15 minutos, con el objetivo de desprender las bacterias que se habían adherido al vidrio ya sea modificado como sin modificar. Se realizó una dilución 1:10 tomando 100 µL del tubo y colocándola en un tubo eppendorf con 900 µL de agua estéril. Se realizaron

luego dos diluciones seriadas más y se plaquearon 100 μ L de la última y anteúltima dilución en una placa de Petri con agar nutritivo. En el caso de los vidrios modificados FilSiQD-PEG irradiados se plaquearon las dos primeras diluciones. Las placas de Petri se colocaron en la incubadora a 31°C por 24 horas. Una vez cumplido el tiempo se contaron las colonias de la dilución que correspondía a un mismo número de colonias (entre 30 y 300).

CAPÍTULO

3

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
QUANTUM DOTS

3.1. Introducción

Para cumplir el objetivo de formar superficies fotoactivas capaces de ser usadas para inactivación fotodinámica de microorganismos resulta indispensable elegir apropiadamente que partícula fotoactiva será embebida en el film.

Por otro lado era necesario que la partícula a utilizar fuera capaz de generar oxígeno singlete, pero adicionalmente se buscaba una partícula estable y con un proceso de síntesis que involucre la menor cantidad de reactivos tóxicos o potencialmente tóxicos. También sería deseable un proceso de síntesis que pudiese ser escalable.

Para este trabajo se utilizaron QD de silicio derivatizadas con polietilenglicol (SiQD-PEG), estas partículas han sido desarrolladas previamente en el grupo de trabajo [123].

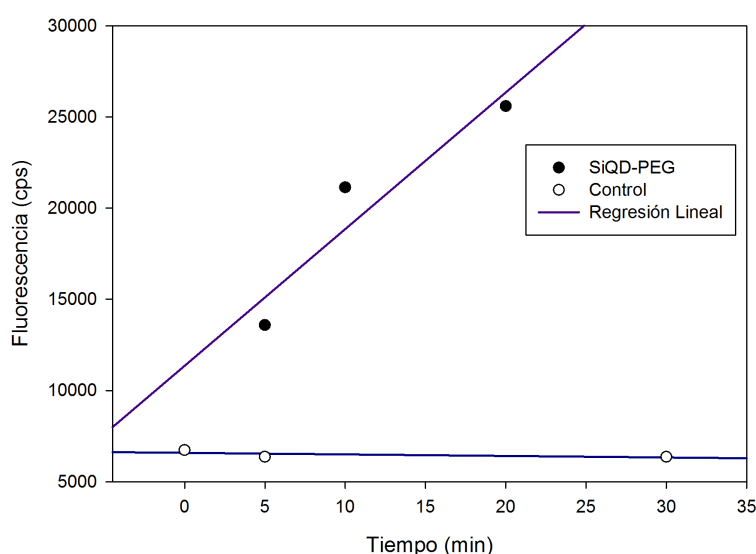


Figura 3.1: Producción de Oxígeno singlete con respecto al tiempo de SiQD-PEG en solución, medido por fluorescencia de SOSG®.

Estudios anteriores del grupo reportan que estas nanopartículas presentan buena producción de oxígeno singlete, como se observa en el gráfico de la figura 3.1 (adaptado de los datos de la publicación). Adicionalmente, las SiQD-PEG son intensamente fotoluminiscentes a temperatura ambiente, lo que resultó de gran utilidad para este trabajo (como se observará en el capítulo 4). Por otro lado, debido a que la superficie de estos QD está modificada con PEG hace que las partículas sean muy estables en solventes polares, en particular el agua, propiedad fundamental a la hora de trabajar con sistemas vivos.

Para algunos de los ensayos de este trabajo se utilizaron como control QD de silicio débilmente oxidados en su superficie. Estos QD también han sido desarrolladas en el grupo y su reacción de síntesis se describe en la sección 3.2.2.

En las figuras 3.2 y 3.3 se muestran vistas esquemáticas de SiQD-PEG y SiQD, respectivamente, donde también se muestra una perspectiva más detallada de la composición de la superficie de cada partícula.

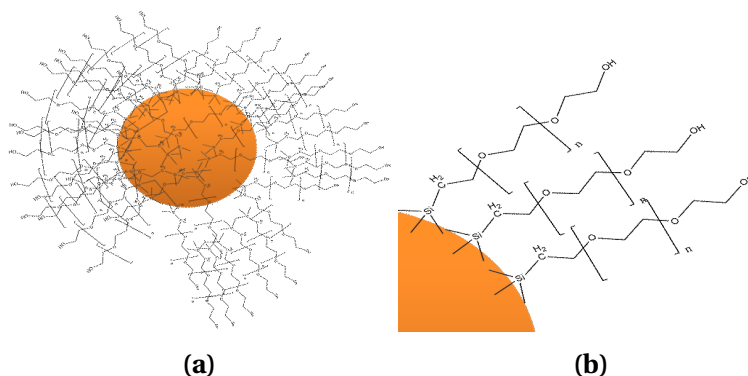


Figura 3.2: Vistas esquemáticas de SiQD-PEG.

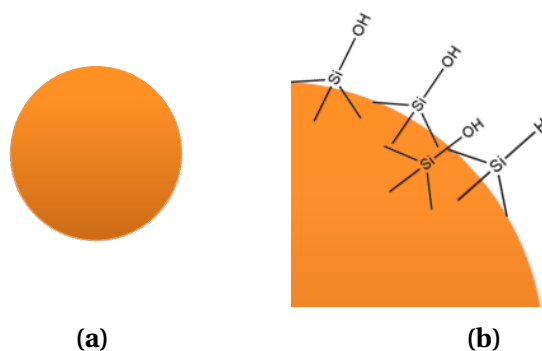


Figura 3.3: Vistas esquemáticas de SiQD.

El desarrollo de este capítulo comenzará por una descripción del proceso de síntesis y purificación de las partículas utilizadas, seguido por ensayos de caracterización.

3.2. Reacciones de Síntesis.

3.2.1. Síntesis de SiQD - PEG

Para sintetizar los SiQD-PEG que fueron utilizados a lo largo de este trabajo de tesina, se ensambló un equipo como el que se muestra en la figura 3.4. Posteriormente, en el balón se introdujeron 10.00 ml de PEG, la platina de calentamiento se ajustó a 100°C (temperatura que se mantendrá a lo largo de la reacción) y se inició el suministro de Argón. Una vez alcanzados los 100°C, se agregaron 100.0 mg de Mg_2Si al balón de reacción; pasados 20 minutos se incorporaron 184.6 mg de NH_4Cl y luego de 30 minutos se cortó el suministro de Ar, cubriendo la boca del balón con un tapón para asegurar que no ingrese oxígeno. La reacción continuó por 24 hs más.

Para finalizar la reacción se apagó el calentamiento de la platina, e inmediatamente se filtraron los productos de síntesis utilizando un equipo de filtración por vacío para separar los restos más groseros de precursores sin reaccionar, cabe destacar que es importante que este proceso se realice en caliente, debido a que la viscosidad del polietilenglicol aumenta considerablemente al bajar la temperatura, lo que podría dificultar en gran medida el proceso de filtrado. Por esta misma razón se agrega H_2O Mili-Q durante el proceso en la cantidad que resulte necesario.

Posteriormente los productos de filtrado son dializados durante 30 minutos para finalmente obtener una suspensión de SiQD-PEG.

3.2.2. Síntesis de SiQD

Con el objetivo de sintetizar quantum dots de silicio (SiQD) se armó un equipo como el descrito en la figura 3.4. En el balón de reacción se introdujeron 60.0 ml de DMF, que fue llevada a reflujo (170°C) con constante suministro de Argón. Una vez estabilizada la temperatura en 170°C se pesaron e incorporaron al balón de reacción 100.0 mg de Mg_2Si , y 20 minutos después se agregaron 184.6 mg de NH_4Cl ; 30 minutos después se cortó el suministro de Argón y se dejó continuar la reacción por 24 hs.

De forma similar a la reacción de síntesis de SiQD - PEG se filtraron los productos de reacción en un equipo de filtración asistida por vacío; en contraste con la síntesis anterior, sin embargo, antes de realizar el paso de diálisis se necesitó hacer un cambio de solvente. Con el fin de separar las partículas de la DMF se utilizó un evaporador rotativo para separar el solvente, y luego se resuspendieron las partículas en H_2O Mili-Q. Finalmente, una vez resuspendidas ya finalmente fueron dializadas para obtener una suspensión acuosa de SiQD.

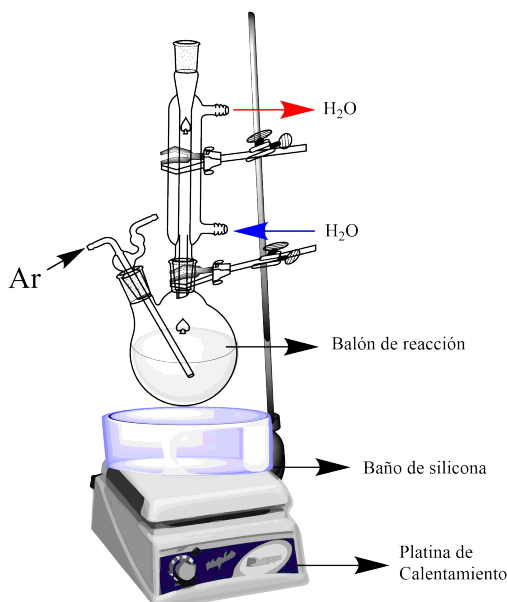


Figura 3.4: Representación del equipo utilizado para la síntesis de QDs

3.3. Caracterización de Quantum Dots

3.3.1. ATR - FTIR

Para obtener información sobre la composición química de los SiQD empleados en el trabajo se midieron espectros ATR-FTIR de ambos. En el caso de SiQD-PEG se utilizó una suspensión concentrada de partículas y en el caso de SiQD se dispersaron las partículas en KBr calidad FTIR. Los espectros se observan en las figuras 3.5 y 3.6.

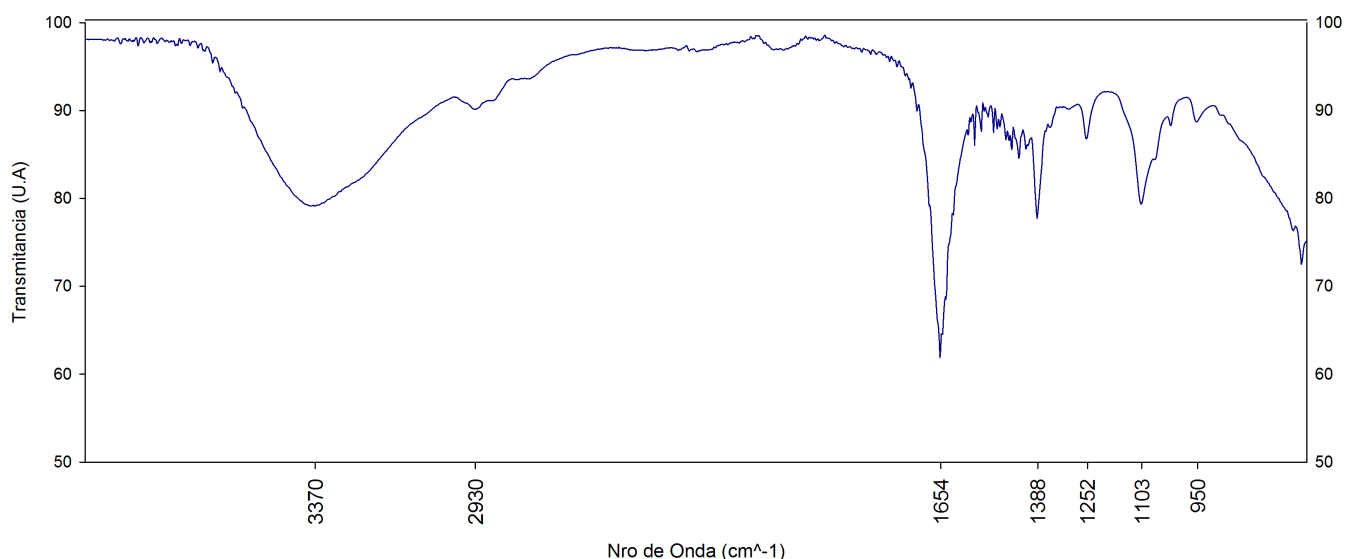


Figura 3.5: Espectro de ATR de SiQD

En el espectro de SiQD (figura 3.5) se observan picos a 950 y 1103 cm^{-1} , que se pueden asociar a vibraciones de los enlaces Si–OH, resultantes de la oxidación parcial de la superficie de la partícula durante los procesos de síntesis y purificación.

Se detectan también vibraciones a 2930, 1388 y 1253 cm^{-1} , que se pueden asociar a distintos tipos de enlaces C–H (CH, CH₂ y CH₃ para los dos últimos).

También se observaron picos a 1653 y 656 cm^{-1} , que se pueden relacionar con las vibraciones de los enlaces C=O y N–H. Todos los enlaces mencionados en este párrafo no son consistentes con la estructura del QD, pero sí con la presencia de solvente residual de la reacción de síntesis.

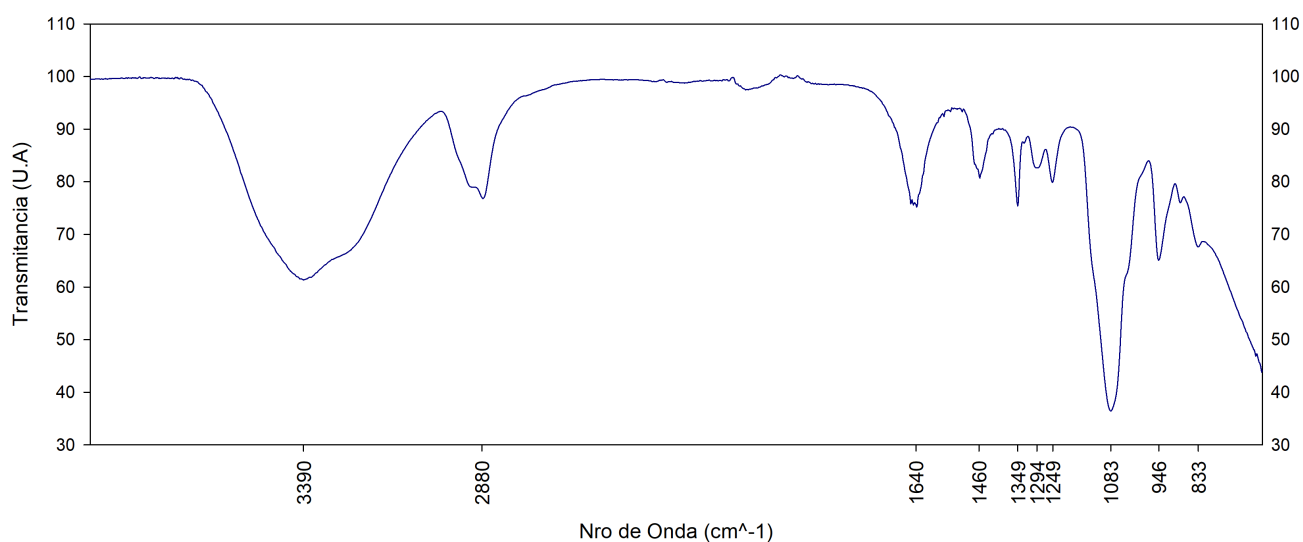


Figura 3.6: Espectro de ATR de SiQD-PEG

En el espectro de SiQD-PEG se observan picos a 1249 y 1470 cm^{-1} que se pueden asignar a la vibración

de los enlaces Si-C y Si-CH₂ debidos al PEG enlazado a la superficie de las partículas. Las señales a 833, 946, 1083 y 2880 cm^{-1} se corresponden a los enlaces C-C, C-OH , C-O-C y C-H presentes en el PEG. Los picos a 3480 y 1641 cm^{-1} se pueden asociar a la presencia de agua .

3.3.2. Matrices de Excitación-Emisión

Se obtuvieron matrices de emisión-excitación para ambas partículas en solución acuosa, la medida se hizo a temperatura ambiente (298K).

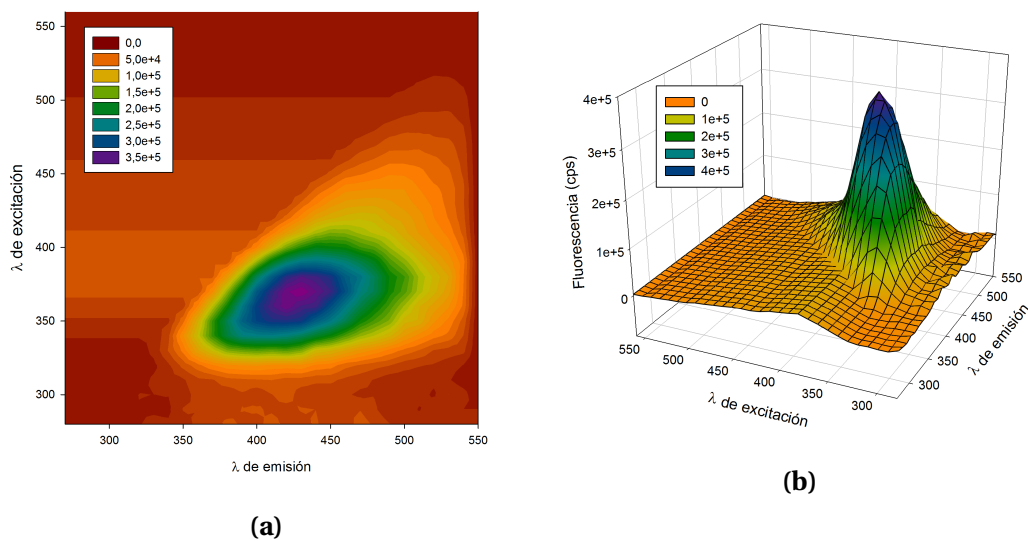


Figura 3.7: Matrices de excitación-emisión de SiQD.

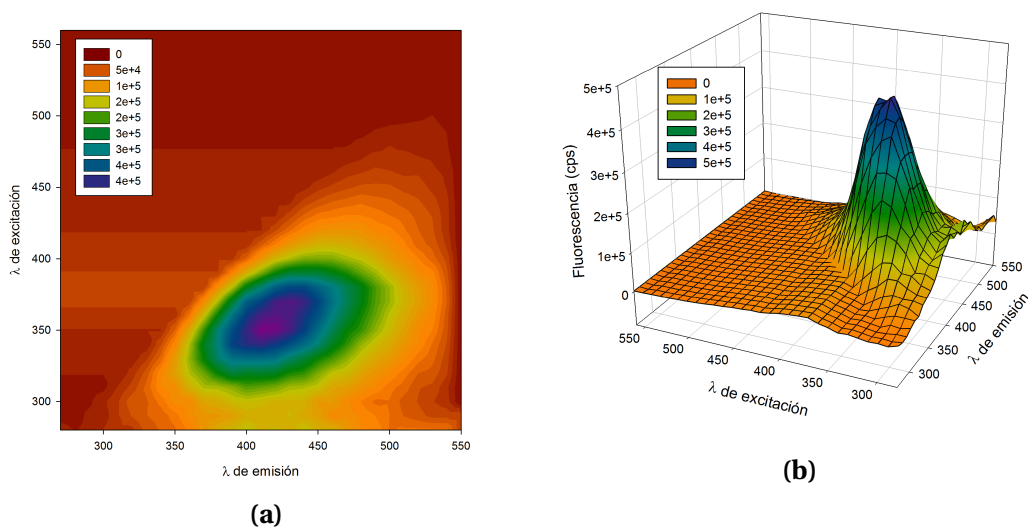


Figura 3.8: Matrices de excitación-emisión de SiQD-PEG.

En ambos casos se observó que el máximo de excitación se produjo entre 350 y 400 nm, mientras que la emisión máxima se produjo entre 400 y 450 nm. El hecho que ambos QD presenten matrices muy similares se puede relacionar con que ambas presentan un núcleo de Silicio de tamaño similar[123].

3.3.3. Espectro UV-VIS

Se midió el espectro de absorción UV-Visible de ambos QD. Debido a que estas partículas dispersan luz a ciertas longitudes de onda, se utilizó una esfera integradora. Se muestran los espectros obtenidos en la figura 3.9.

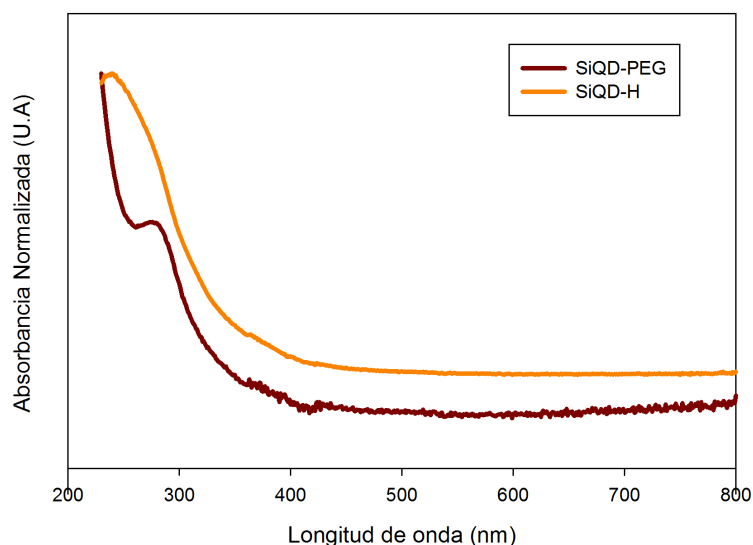


Figura 3.9: Espectro de absorción UV-VIS de ambos QD. Los datos se normalizaron por la máxima medida de cada espectro.

A partir de la observación de los gráficos obtenidos se verifica que existe absorción entre 350 y 400 nm para ambas muestras, en donde se halla el máximo de excitación para el núcleo de Silicio.

3.3.4. Laser Flash Fotólisis

A fin de explorar la fotoquímica y capacidad de producción de especies reactivas de las nanopartículas se decidió utilizar un equipo de fotólisis por destello. La idea detrás de utilizar esta técnica fue observar si se generaban productos transientes en la vía de desactivación de ambos QD.

El arreglo experimental disponible no permite evaluar transiciones a tiempos cortos (décimos de pico-segundo), normalmente asociados con transiciones singlete-singlete; esta limitación está dada tanto por la fuente de excitación como por la de análisis. Por otro lado, el equipo disponible si permite observar transiciones triplete-singlete.

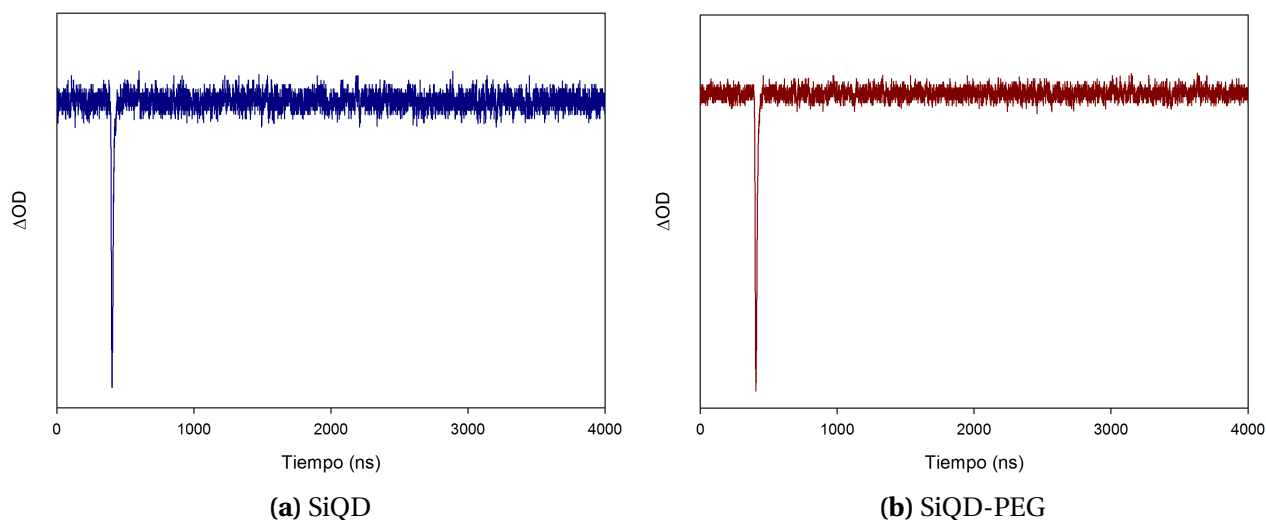


Figura 3.10: ΔOD vs tiempo para SiQD (azul) y SiQD-PEG (rojo).

Al realizar el experimento no se observaron trazas correspondientes a la formación de productos de reacción a ninguna longitud de onda. Se muestran como ejemplo los resultados obtenidos a $\lambda=400$ nm.

Los resultados obtenidos nos indican que, en las condiciones evaluadas (soluciones acuosas de los QD $Ab_{350}=0.05$) no se generan productos cuyas vías de desactivación incluyan transientes. De hecho solo se observa un evento, que podría asociarse a la emisión fluorescente de la muestra.

3.3.5. Determinación de Estabilidad de SiQD's

Con el objetivo de evaluar la estabilidad de las SiQD y SiQD-PEG a distintas condiciones de temperatura se diseñó el siguiente experimento: Se separaron en tres alícuotas distintas muestras de cada uno de los QD; luego una de las alícuotas fue dejada como control, otra fue congelada y la última fue sometida a un tratamiento de autoclave (121°C , 1 atm de sobrepresión). Posteriormente se verificó la integridad del núcleo de ambos QD a partir de medidas de fluorescencia en forma de matrices de excitación-emisión. Los resultados se observan en las figuras 3.11 y 3.12.

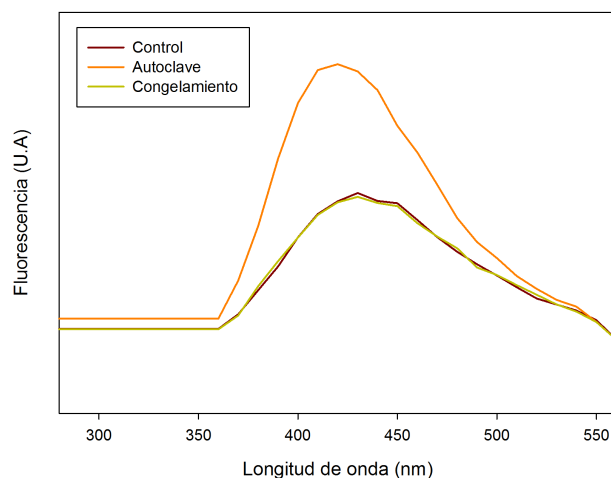


Figura 3.11: Ensayos de Estabilidad de SiQD. En el recuadro se detallan los tratamientos efectuados.

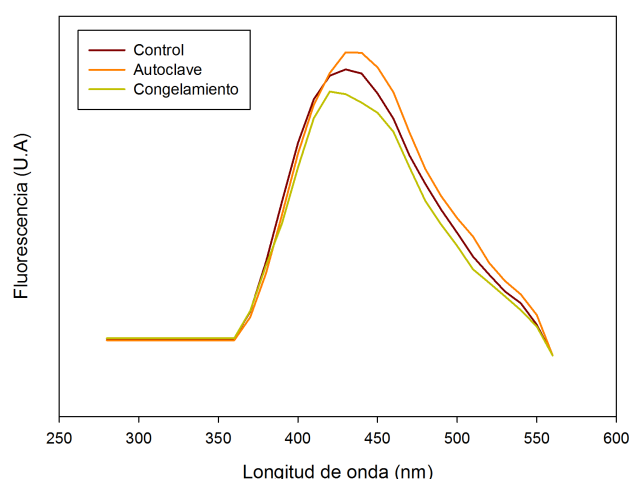


Figura 3.12: Ensayos de Estabilidad de SiQD-PEG. En el recuadro se detallan los tratamientos efectuados.

En la figura 3.11 se observa que la intensidad de fluorescencia aumenta notablemente al comparar el tratamiento de autoclave con el control. Un aumento de este tipo en QD de silicio está reportado en bibliografía y se asocia a la oxidación parcial de la superficie del QD[124]. Esto implicaría que ante repetidas exposiciones a condiciones similares las SiQD podrían oxidarse completamente, lo que daría lugar a la pérdida de su capacidad fotoluminiscente. En cambio, la figura 3.12 muestra que las SiQD-PEG muestran mayor estabilidad en su fotoluminiscencia al ser manipuladas y sometidas al congelamiento y la autoclave. Luego podría concluirse que el recubrimiento de PEG mejora la estabilidad de los QD.

3.4. Conclusiones Parciales

- Se lograron sintetizar QD de Silicio funcionalizadas con PEG empleando y adaptando procesos de síntesis previamente desarrollados por el grupo. Adicionalmente se caracterizaron las nanopartículas

mediante ATR-FTIR. Esta técnica permitió también observar que, pese a los pasos de purificación que se realizaron, aún quedan restos del solvente usado en la síntesis en las muestras de SiQD.

Asimismo, los QD que se utilizaron cumplieron con los requerimientos que se enunciaron en la introducción de este capítulo.

- A partir del análisis de las matrices de excitación - emisión se pudo concluir que ambos QD parecen tener un núcleo de similares características y tamaño. A partir de las medidas de Laser Flash Fotólisis se pudo concluir que no se producen intermediarios transientes observables en el intervalo de longitudes de onda accesibles con el equipo disponible (300-700 nm) como consecuencia de la desactivación de los estados excitados de los QD.
- Los ensayos de estabilidad muestran que la cobertura de PEG en SiQD-PEG mejora la estabilidad ante altas temperaturas.

CAPÍTULO

— 4 —

FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FILMS BASADOS EN SÍLICE. ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS.

4.1. Introducción

El objetivo que se persigue en este capítulo es desarrollar films homogéneos de sílice porosa con SiQD-PEG inmovilizadas en su interior y, fundamentalmente, que se pueda aprovechar la capacidad de generar oxígeno singlete de los QD para que estos films puedan ser utilizados para la inactivación fotodinámica de *Staphylococcus aureus*. Para cumplir estos objetivos se optimizará la técnica de formación de films, se caracterizará la superficie formada y se evaluará la producción de ROS. Por último, se evaluarán los efectos que generan estos films en la formación de biofilms bacterianos.

4.2. Optimización en la formación de films

Durante este trabajo se probaron diversas técnicas para formar un film lo más homogéneo posible. Resulta imperativo cubrir completamente las superficies que se busca proteger, ya que la adhesión de bacterias conducirá a que un sitio no cubierto pueda transformarse en una ubicación preferencial para la formación de biofilms bacterianos.

Para obtener una superficie continua sin quebraduras se ensayaron diversas técnicas de formación de films, basadas en los ensayos descritos en la sección 2.3. Se controló la homogeneidad y la fotoluminiscencia de las superficies mediante microscopía de epifluorescencia. La utilización de esta técnica es factible porque las SiQDs presentan intensa fluorescencia, que nos permite observar la topografía de los films. En las secciones siguientes se describen los distintos procedimientos explorados para llegar a ese fin. La magnificación de las imágenes es 100x, salvo cuando se indique lo contrario.

4.2.1. Formación de films.

Los recubrimientos se generaron poniendo en contacto los vidrios a modificar con soluciones conteniendo los precursores necesarios para la formación del film. A lo largo de esta sección se muestran las variaciones sobre esta técnica y los resultados obtenidos. Los ensayos 1 y 2 se realizaron utilizando SiQD en lugar de SiQD-PEG, debido a que en el momento en que se realizaron no se disponía del reactivo PEG.

Ensayo 1: Formación de films por volcado y evaporación. Evaluación del efecto de la temperatura y la concentración de SiQDs

Para formar los films se preparó una mezcla de reacción como la detallada en la tabla 4.1, la que se volcó en una placa de Petri conteniendo los vidrios a derivatizar. Posteriormente, se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente para que se deposite el film sobre los vidrios.

En la figura 4.1 se observan las imágenes de microscopía de epifluorescencia de los films formados por esa técnica. Se puede observar que la cobertura de la superficie no es óptima, son evidentes grandes y numerosas quebraduras que dejan grandes áreas de vidrio descubierto; evidenciable por las zonas oscuras de la imagen.

A partir de los defectos encontrados en el ensayo anterior se buscó modificar la técnica para corregirlos. En primer lugar, se decidió realizar el paso de evaporación del etanol a una temperatura baja (5°C), suponiendo que la evaporación a temperatura ambiente podría haber sido demasiado rápida, impidiendo la formación de un film homogéneo.

Reactivo	Volumen
EtOH	3,4 ml
TEOS	1,3 ml
H ₂ O _{mQ}	0,4 ml
SiQD	34 μ L
HNO ₃	34 μ L

Tabla 4.1: Mezcla de reacción para el ensayo 1.

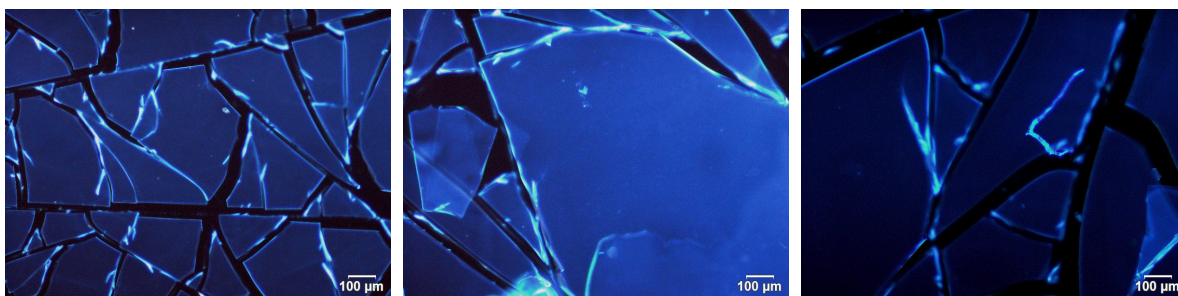


Figura 4.1: Imágenes de Epifluorescencia de films con SiQD - H formados por evaporación a T_{Amb} .

Adicionalmente se aumentó la carga de SiQD en la mezcla de reacción, con el objetivo de evaluar si se podrían formar vidrios con una carga mayor de nanopartículas de forma que los vidrios vean aumentada su capacidad de emisión fotoluminiscente. La composición de la mezcla de reacción se muestra en la tabla 4.2.

Reactivo	Volumen
EtOH	3,4 ml
TEOS	1,3 ml
H ₂ O _{mQ}	0,4 ml
SiQD	Ajustado a $Ab_{s350} = 0,8$
HNO ₃	34 μ L

Tabla 4.2

En la figura 4.2 se observan las imágenes de epifluorescencia tomadas a los vidrios modificados. Éstas muestran una película con problemas similares de homogeneidad a aquella formada en los ensayos anteriores.

Un aspecto positivo es que las imágenes pudieron ser tomadas con un tiempo de exposición de 0.5 segundos, producto de la mayor carga de nanopartículas que genera una mayor intensidad fotoluminiscente.

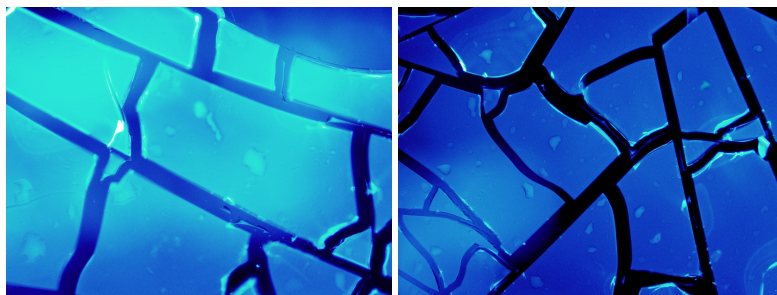


Figura 4.2: Imágenes de Epifluorescencia de films con SiQD - H por evaporación en frío.

Para evaluar si el secado más rápido que se produce a temperaturas moderadamente altas podría dar lugar a la formación de films más homogéneos se realizó un ensayo de formación de películas por evaporación a 37 °C.

Para ello, luego de volcar la mezcla de reacción sobre los vidrios a modificar, se introdujeron las placas en una incubadora termostatzada a 37 °C. La composición de la mezcla de reacción no se modificó y corresponde a la enunciada en la tabla 4.2. Como se observa en las imágenes de la figura

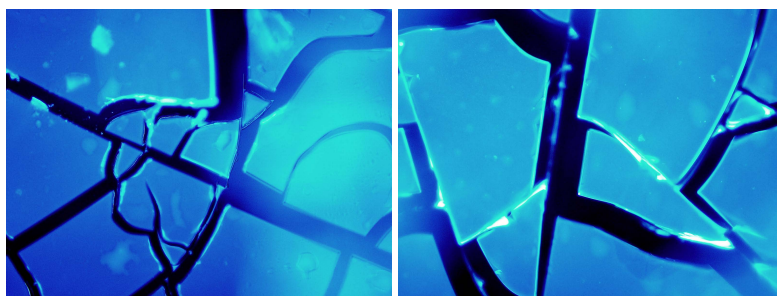


Figura 4.3: Imágenes de Epifluorescencia de films con SiQD - H por evaporación a 37°C.

4.3 los films siguen presentando los mismos problemas de discontinuidad que se evidenciaron en todos los ensayos realizados previamente.

Debido a que ninguno de los procedimientos realizados condujo a una película homogénea y con cobertura total de la superficie del vidrio, se consideró formar películas por Dip-Coating.

Ensayo 2: Formación de films por Dip Coating. Evaluación del efecto de la temperatura y número de repeticiones.

Dado que en el laboratorio donde se desarrolló este trabajo no se dispone de un sistema automatizado para la elaboración de películas delgadas por el método de inmersión, debió optimizarse un método manual. Para ello se utilizó un caloventor como dispositivo de secado, prestando especial atención en mantener constantes y reproducibles las condiciones experimentales, tales como temperatura y tiempo de secado, velocidad de inmersión y corriente de aire.

La mezcla de reacción utilizada es la misma que se detalla en la tabla 4.2, salvo cuando se indique lo contrario.

Como se mencionó en párrafos anteriores y en la sección 2.9, al utilizar la técnica de Dip Coating se puede variar el número de ciclos de inmersión y secado de forma de optimizar la formación de películas lo más homogéneas posible, tal como se describe a continuación. Luego de sumergir los vidrios en la mezcla de reacción, se secaron frente a una corriente de aire a aproximadamente 65 °C. En la figura 4.4 se muestran los resultados.

Luego de sumergir los vidrios en la mezcla de reacción, se secaron utilizando el caloventor previamente mencionado. En la figura 4.4 se observan los resultados.

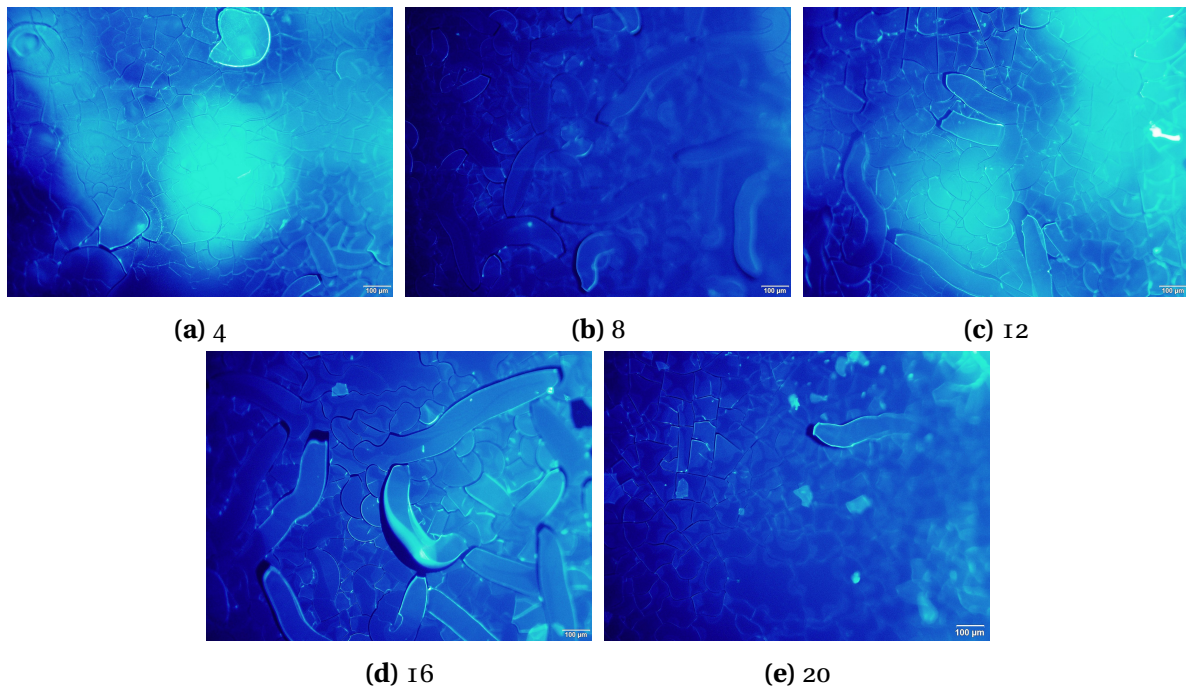


Figura 4.4: Imágenes de microscopía de epifluorescencia de films con SiQD formados por Dip Coating utilizando distinto numero de ciclos. Se indica el número de ciclos realizados debajo de cada imagen.

En las imágenes obtenidas se observan películas más homogéneas y con menos quebraduras que las formadas por volcado. A pesar de esta mejora, se siguen notando zonas con mayor intensidad de fluorescencia debido al grosor irregular del film.

En la figura 4.5 se observa este fenómeno, ambas imágenes están tomadas en la misma ubicación en los ejes x e y, pero en un plano vertical distinto (z).

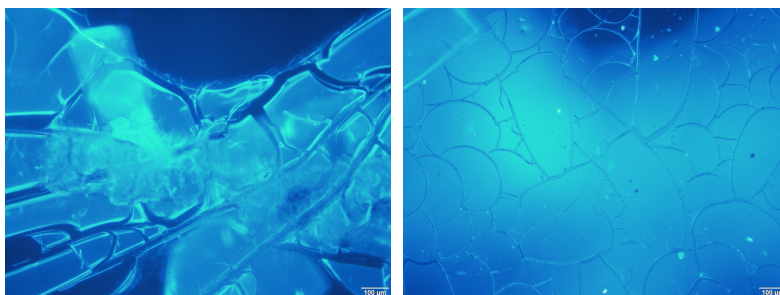


Figura 4.5: Imágenes de películas formadas en distintos planos.

Con respecto al número de repeticiones, se observa que los films mejor conformados y homogéneos son aquellos que se formaron con más de 12 ciclos; no observándose mejorías a partir de ese número de repeticiones.

Para evaluar el efecto de la temperatura de secado de los vidrios sobre la calidad del film, se realizó el proceso de secado a temperatura ambiente, utilizando una corriente de aire.

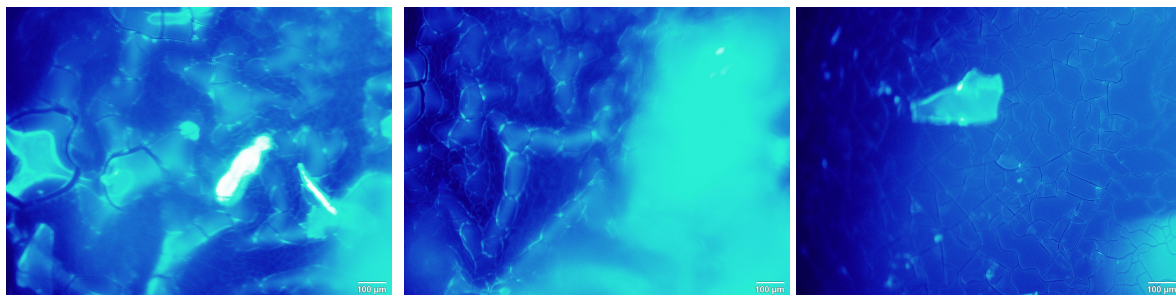


Figura 4.6: Imágenes de películas formadas por Dip Coating a T_{amb} .

En las imágenes de la figura 4.6 se puede observar que la película formada tiene una estructura bastante irregular y con discontinuidades más importantes que las formadas empleando una corriente de aire caliente. Estos defectos estructurales podrían estar ocasionados por un secado inapropiado entre repeticiones, que impediría la formación de un film homogéneo en capas.

Adicionalmente cuando se evaluó qué ocurriría al prescindir de la corriente de aire (manteniendo el calentamiento) en el secado de los films, los films obtenidos resultaron sumamente discontinuos.

Ensayo 3: Dip Coating con secado en caliente. SiQD-PEG disueltas en EtOH

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se llegó a la conclusión de que la formación de films por dip coating empleando una corriente de aire caliente representaba la mejor alternativa. Por ello, se repitieron los ensayos con SiQD-PEG en estas condiciones pero variando la cantidad de nanopartículas en la película de forma de obtener una concentración óptima. Para cumplir este objetivo, se prepararon suspensiones de SiQD-PEG en EtOH que presentaban distintas absorbancias a 350 nm: $Abs_{350}^* = 0,5; 1; 2$ y $3,2$ las que se utilizaron para preparar los films. Las suspensiones con $Abs_{350}^* = 0,5; 1$ y 2 dieron lugar a la formación de films, mientras que al intentar formar films con la suspensión de $Abs_{350}^* = 3,2$ la película adquiere apariencia de gel.

Para poder aumentar la carga de SiQD's sin alterar en gran medida los volúmenes utilizados, se decidió suspender las partículas en EtOH que luego se utilizaría para formar los films; adicionalmente se emplearon SiQD-PEG para este ensayo. Se utilizó como referencia para la concentración de SiQD la absorbancia que se midió de las suspensiones en EtOH a $\lambda = 350$ nm (Abs_{350}^*).

Teniendo en cuenta estas observaciones, se decidió continuar con la preparación de films a partir de suspensiones de nanopartículas con $Abs_{350}^* = 2$. En la figura 4.7 se observan las imágenes tomadas a estas muestras con un tiempo de obturación de $\frac{1}{7000}$ s, lo que se correlaciona con una fuerte emisión fotoluminiscente del film ocasionada por la gran cantidad de nanopartículas inmovilizadas en el.

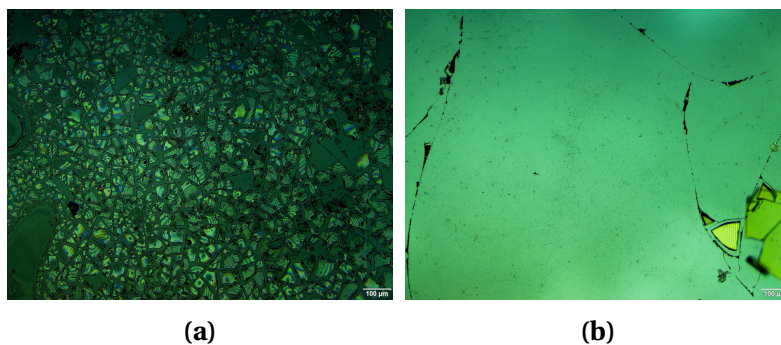


Figura 4.7: Imágenes de películas formadas por Dip Coating, con suspensiones de SiQD-PEG suspendidas en EtOH y $Ab_{350}^*=2$.

4.3. Caracterización de Films

Se caracterizaron varias variantes de vidrios modificados, cuyas características y nomenclatura se enuncian a continuación:

- **FilSiQD-PEG:** Films de sílice con SiQD-PEG embebidas. Se generaron utilizando el protocolo definido en el ensayo 3.
- **FilSiQD:** Films de sílice con SiQD embebidas. Se generaron utilizando el protocolo definido en el ensayo 2.
- **FilS:** Films de sílice sin modificar. Se generaron utilizando el protocolo definido en el ensayo 2 modificando la mezcla de reacción (detallado en la tabla 4.3).

Reactivo	Volumen
EtOH	3,4 ml
TEOS	1,3 ml
H ₂ O _{mQ}	0,4 ml
HNO ₃	34 µL

Tabla 4.3

Reactivo	Volumen
Susp. SiQD-PEG $Ab_{350}^*=0.5, 1, 2, 3.2$ en EtOH	3,4 ml
TEOS	1,3 ml
H ₂ O _{mQ}	0,4 ml
HNO ₃	34 µL

Tabla 4.4

Reactivo	Volumen
Susp. SiQD-PEG $Abs_{350}^*=2$ en EtOH	3,4 ml
TEOS	1,3 ml
H ₂ O _{mQ}	0,4 ml
HNO ₃	34 μ L

Tabla 4.5

4.3.1. Ángulo de Contacto

Teniendo en cuenta la importancia de la mojabilidad de un sustrato en los procesos de colonización bacteriana [125, 126], se decidió evaluar dicha variable mediante la medida de ángulo de contacto. Se evaluaron las superficies FilS, FilSiQD y FilSiQD-PEG, además de un vidrio con su superficie sin modificar que será utilizado como control. Los valores de ángulo de contacto se muestran en el cuadro 4.4 y la forma de las gotas en la figura 4.8.

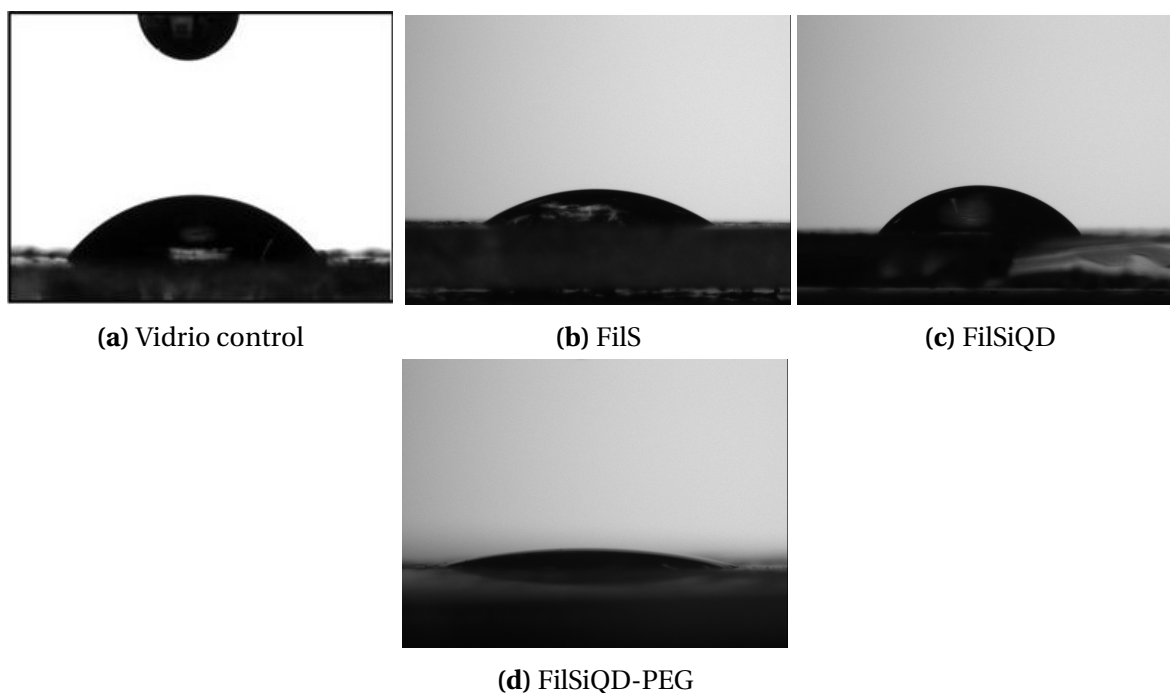


Figura 4.8: Imágenes de gotas de agua sobre cada una de las superficies utilizadas en el trabajo.

Tratamiento	Ángulo de contacto	Desv. Estándar(\pm)
Control	48.7	0.3
FilS	29	2
FilSiQD	48	3
FilSiQD-PEG	12	1

Tabla 4.6: Valores de ángulo de contacto calculados con el software ImageJ

Los resultados obtenidos muestran que todas las superficies, incluyendo el vidrio control, son

hidrofílicas (el ángulo de contacto es $< 90^\circ$ en todos los casos). Sin embargo, los grados de mojabilidad de las superficies son distintos. Al modificar el vidrio construyendo una matriz de sílice (FilS), la superficie se vuelve bastante más hidrofílica.

Al agregar SiQD al vidrio (FilSiQD), el ángulo de contacto se aproxima al de la superficie de control, posiblemente por la similitud química que tienen la superficie de las nanopartículas débilmente oxidadas con el vidrio. La presencia de PEG en la superficie de las partículas genera una disminución importante en el ángulo de contacto, lo cual es esperable teniendo en cuenta el carácter hidrofílico de la molécula de PEG.

4.3.2. Espectro UV-VIS

Se obtuvieron espectros de absorción de las distintas películas, los resultados se observan en la figura 4.9.

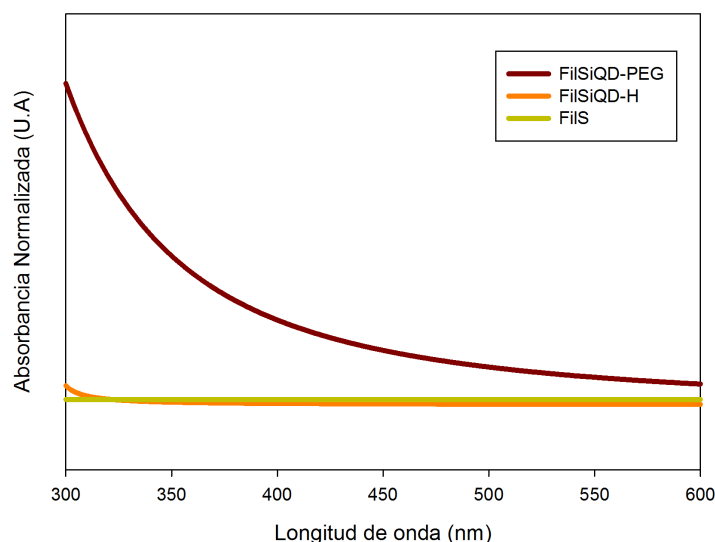


Figura 4.9: Espectro UV-VIS de FilS, FilSiQD y FilSiQD-PEG.

No se observa absorción en la muestra FilS, este resultado tiene sentido, ya que la matriz es químicamente muy similar al vidrio sin modificar, que se utilizó como blanco para obtener la línea de base. La ausencia de absorción de la muestra FilSiQD puede ser explicada por la relativamente baja cantidad de partículas que se han embebido en el film.

En el caso de la muestra FilSiQD-PEG se observa dispersión, consistente con la presencia de una gran concentración de SiQD-PEG en el film.

4.3.3. ATR-FTIR

Es de nuestro interés determinar la composición superficial de las muestras, de forma de obtener información sobre la efectividad en la que las nanopartículas han sido embebidas en la matriz de sílice. Se obtuvieron espectros IR de las muestras FilS, FilSiQD-PEG y FilSiQD.

El espectro de FTIR de la muestra FilS se presenta en la figura 4.10. Se observan bandas de absorción alrededor de 3200 y 1648 cm^{-1} , que se pueden asociar a la adsorción de H_2O en las superficies; el pico que aparece a los 1034 cm^{-1} podría corresponder a la vibración asimétrica del enlace

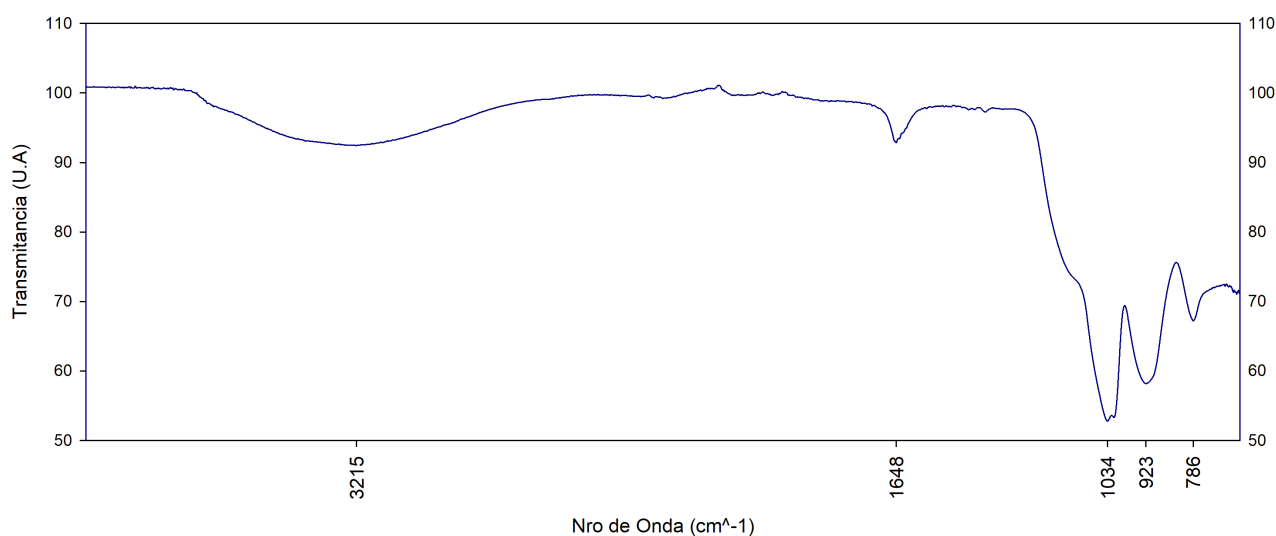


Figura 4.10: Espectro de ATR-FTIR de la matriz FilS.

Si–O–Si y el pico que aparece a 786 cm^{-1} puede asociarse a la vibración simétrica del mismo enlace, mientras que el pico a 923 cm^{-1} se puede atribuir a la vibración del enlace Si–OH. Los picos que aparecen en el espectro son consistentes con la estructura del film FilS, que solo consiste en una matriz de sílice.

En la figura 4.11 se presenta el espectro de FilSiQD, en este se observan picos a 3215, 1648, 1034, 935 y 784 cm^{-1} , que tienen ubicación similar a aquellos observados en el espectro de FilS, con lo cual se puede suponer que pueden deberse a la vibración de los mismos enlaces, asociados a la matriz y a agua adsorbida. También se observan picos a 1466 cm^{-1} y a 1339 cm^{-1} , el primero puede ser asociado a la vibración del metileno, presente tanto en el etanol utilizado para formar la superficie, como en la DMF utilizada en la síntesis de los SiQD, el pico a 1339 cm^{-1} puede ser explicado por la presencia de CO_2 . Los picos característicos de las SiQD a 950 y 1103 cm^{-1} asociados a vibraciones de los enlaces Si–OH no pueden diferenciarse de los picos intensos debidos al film de sílice poroso.

El espectro de la muestra FilSiQD-PEG se presenta en la figura 4.12. En él se observan picos a 3200 cm^{-1} y 1648 cm^{-1} que pueden ser asociados a la adsorción de agua por la superficie; los picos a 784 y 940 cm^{-1} , como se mencionó anteriormente, se asignan a la matriz de sílice. Adicionalmente se observan picos a 839, 1298 y 2880 cm^{-1} que se asocian a las vibraciones de los enlaces C–C, CH_2 y C–H presentes en el PEG. Por otro lado, se observan picos a 1298 y 1457 cm^{-1} que se pueden deber a los enlaces Si–C y Si– CH_2 , consistentes con la unión de PEG a la nanopartícula. Por último el pico ancho a 1046 cm^{-1} podría deberse a la superposición de picos del enlace Si–O–Si de la matriz y el C–O–C del PEG, ya que ambos aparecen en la misma región.

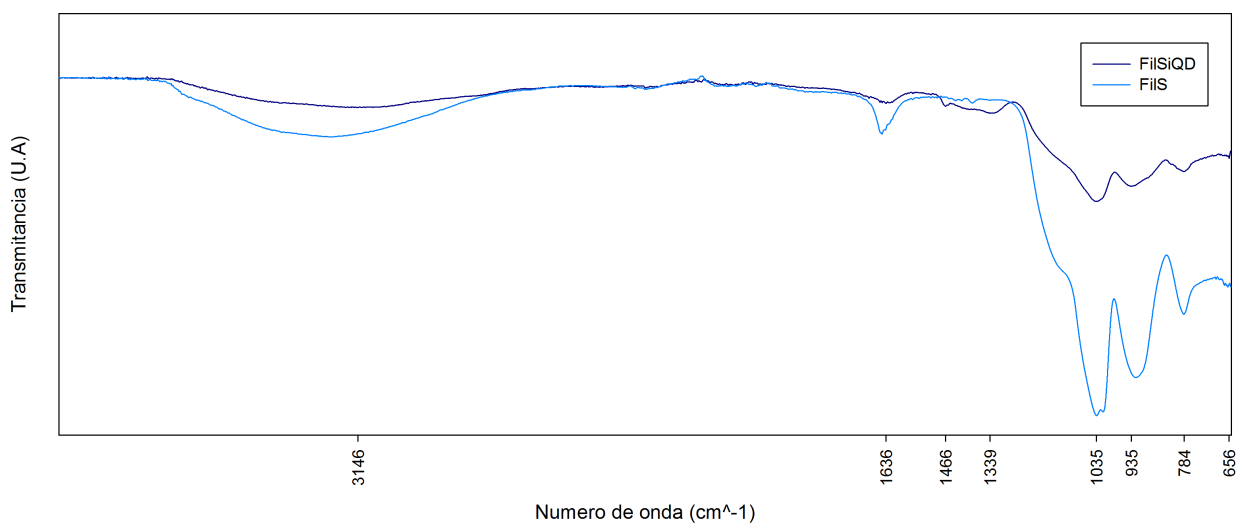


Figura 4.11: Espectro de ATR-FTIR de FilSiQD

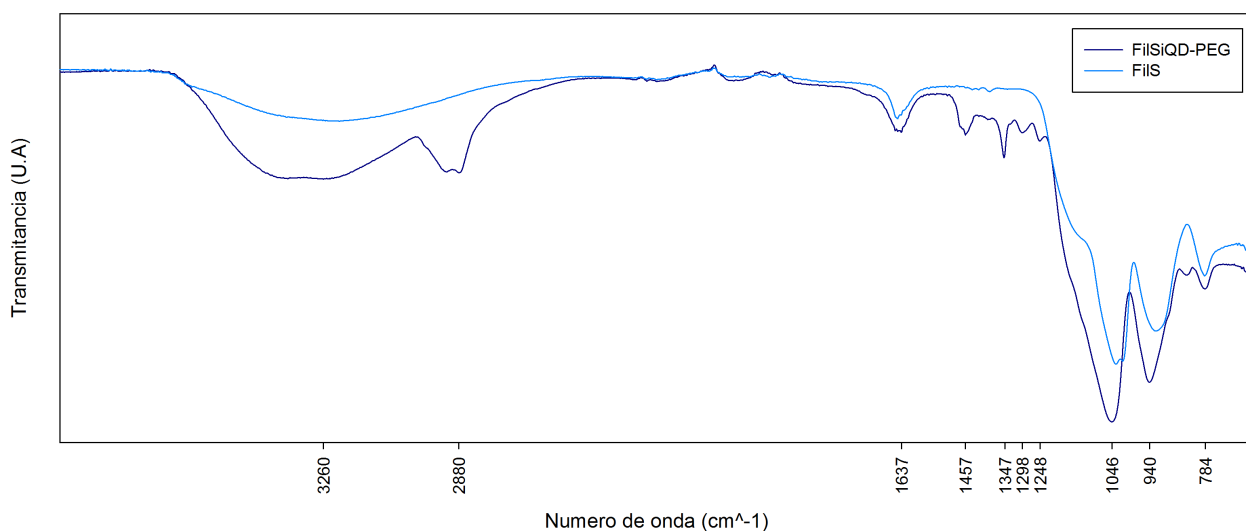


Figura 4.12: Espectro de ATR-FTIR de FilSiQD-PEG.

4.3.4. Producción de ROS

Con el fin de observar la formación de ROS al irradiar los films, se midió la producción de radical anión superóxido y de oxígeno singlete de FilSiQD-PEG utilizando como fuente una lámpara de tubo con emisión centrada en 350 nm que se dispuso a 4 cm de las distintas muestras.

Producción de Radical Anión Superóxido

Se evaluó la capacidad de generación de radical anión superóxido O_2^- en tres preparaciones de FilSiQD-PEG en EtOH que utilizan suspensiones de SiQD-PEG con $Ab_{350} = 0,5$; 1 y 2. Los en-

sayos realizados para todas las superficies mostraron que estas no producen anión superóxido en cantidades significantes.

Producción de Oxígeno Singlete

Se evaluó la capacidad de producción de oxígeno singlete $^1\text{O}_2$ en 3 preparaciones distintas de FilSiQD-PEG que utilizan soluciones de SiQD-PEG en EtOH con $Abs_{350}^* = 0,5$; 1 y 2. En la figura 4.13 se presentan los resultados.

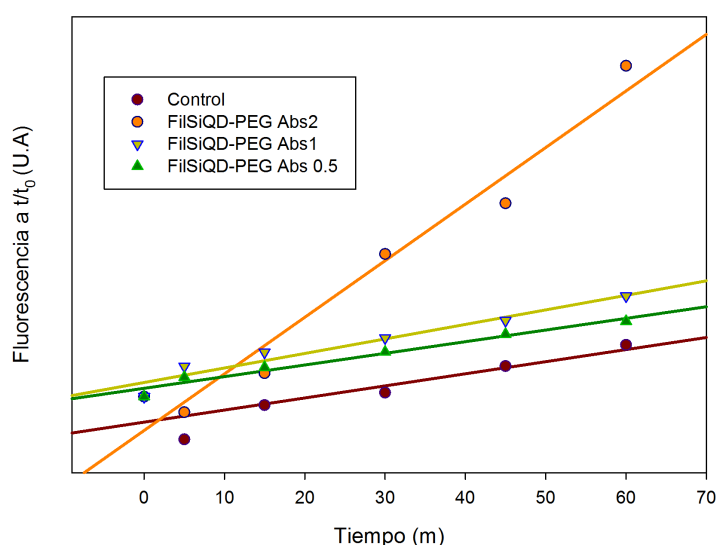


Figura 4.13: Mediciones de $^1\text{O}_2$ para distintas concentraciones de SiQD-PEG en la mezcla de reacción.

Los resultados experimentales muestran un fuerte aumento de la producción de $^1\text{O}_2$ aumenta con la concentración de QDs en el film, observándose que la película FilSiQD-PEG $Abs_{350}^*=2$ tiene una formación de $^1\text{O}_2$ marcadamente mayor que las otras películas.

A partir de los resultados de los ensayos de optimización, absorción de luz en UV-VIS y producción de ROS, se puede concluir que el diseño óptimo de películas para su empleo en los ensayos biológicos es FilSiQD-PEG preparadas con una suspensión de nanopartículas de $Abs_{350}^*=2$.

4.4. Ensayos Microbiológicos

En esta sección se evalúa la capacidad de los recubrimientos de vidrios con nanopartículas SiQD-PEG (FilSiQD-PEG) de inhibir la adhesión de bacterias que conduce a la formación de biofilms bacterianos. Para este fin se realizaron dos experimentos (Ensayos A y B), utilizando como microorganismo modelo *Staphylococcus aureus* ATCC 2592. Adicionalmente, para verificar que los efectos observados son inherentes al uso de las nanopartículas, se utilizaron como controles el vidrio modificado FilS y el vidrio sin modificar. Los ensayos con FilS brindarán información sobre los efectos de la nano y microestructura superficial (film poroso de SiO_2) sobre la formación de biofilms bacterianos.

En el primer ensayo se evalúa la capacidad de las películas de inhibir la etapa de adhesión bacteriana a las superficies de vidrio, mientras que en el segundo ensayo se investiga la capacidad de inactivar biofilms en sus etapas tempranas de formación (2 hs). En ambos ensayos se utiliza luz UV de 350 nm para la generación fotosensibilizada de oxígeno singlete.

4.4.1. Inactivación fotodinámica durante la colonización de superficies.

La finalidad de este ensayo (Ensayo A) es evaluar la capacidad de las películas de inhibir la adhesión inicial de bacterias sobre las superficies de vidrio. Para ello se realizó el ensayo como se describe en la sección 2.14.3. Brevemente, se depositó una gota de inóculo sobre los vidrios modificados FilSiQD-PEG y FilS y sobre un vidrio sin modificar; luego los vidrios se expusieron a luz UV y se procedió a realizar conteos para evaluar los efectos producidos. En la figura 4.14. se muestran los resultados del ensayo.

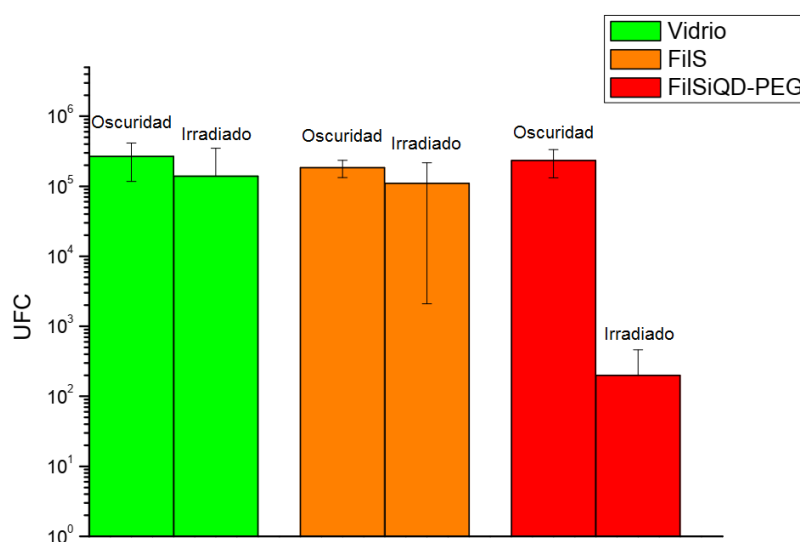


Figura 4.14: Conteos de bacterias adheridas a vidrios modificados en oscuridad e irradiados.

En la figura puede notarse que en oscuridad no se distinguen cambios significativos con respecto a la adhesión de bacterias a las superficies. La nanoestructura superficial de la película, la composición y las propiedades fisicoquímicas no mostraron influencia sobre el proceso de adhesión y replicación de las 2 primeras horas. Sin embargo, al irradiar las muestras con luz UV, se encontró una disminución en la cantidad de bacterias adheridas en la superficie FilSiQD-PEG de casi tres órdenes de magnitud entre las medias con respecto a los otros dos controles. Cabe aclarar que cuando se realizó una evaluación estadística ANOVA con un test de Tukey con $p < 0,05$ estas diferencias no resultaron significativas, aún cuando las observaciones microscópicas (Sección 4.4.3) también corroboraron el decrecimiento, posiblemente debido a las importantes desviaciones en los resultados de los conteos. El efecto de la disminución en la cantidad de bacterias probablemente esté relacionado con la capacidad de SiQD-PEG de fotosensibilizar oxígeno singlete producido por la irradiación UV [80](Fig.4.13).

4.4.2. Inactivación fotodinámica de biofilms de 2hs

En este ensayo (Ensayo B) se evaluaron los efectos de FilSiQD-PEG en biofilms tempranos (2hs). Para ello se realizó el ensayo como está descrito en la sección 2.14.3. A diferencia del caso anterior, en el que la adhesión de bacterias se producía durante la irradiación, en este ensayo se forma previamente un biofilm temprano y luego se lo irradia. Puede notarse (4.15) que el número de bacterias adherido en el caso del control alcanzó un número de microorganismos un orden mayor que el correspondiente al ensayo A, debido al mayor tiempo de exposición (el biofilm se formó sin irradiación y luego se lo expuso al medio de cultivo durante las 2 h adicionales durante las cuales se lo irradiaba con luz UV). Sin embargo, el número de bacterias adheridas y crecidas en los medios tratados fue menor que el control, por lo tanto, a mayor tiempo de crecimiento pudo notarse que la nanoestructura superficial de la película, su composición y/o propiedades fisicoquímicas influyeron sobre el proceso de adhesión y replicación, particularmente en el caso de FilSiQD-PEG. En todos los casos se observó la influencia de la irradiación que, si bien no produjo un descenso estadísticamente significativo en el caso del FilS, el mismo fue corroborado por observaciones por microscopía de campo claro, como se detalla en la sección siguiente. Cabe destacar que la muestra FilSiQD-PEG irradiada mostró un descenso estadísticamente significativo $p < 0,05$ en el número de bacterias adheridas de cuatro órdenes respecto al control irradiado.

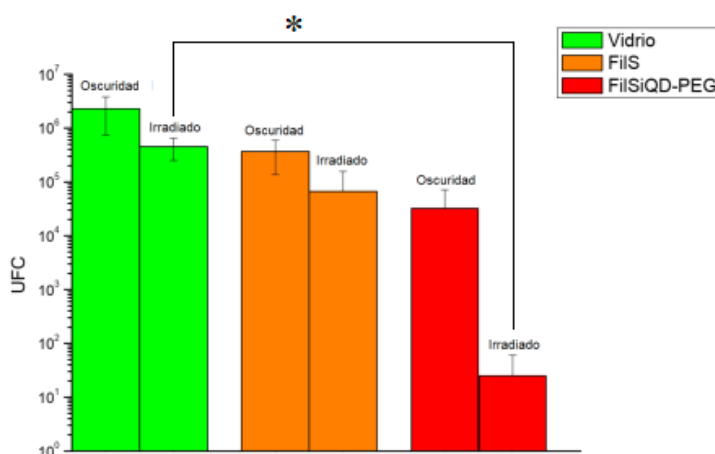


Figura 4.15: Conteos de bacterias adheridas a vidrios modificados en oscuridad e irradiados. * implica significancia estadística con $p < 0,05$.

4.4.3. Microscopía de campo claro.

Para observar los efectos que produce la irradiación en presencia de FilSiQD-PEG sobre la formación de biofilms y su morfología, se repitieron los ensayos de las dos secciones anteriores, pero en lugar de contar las bacterias adheridas a los vidrios modificados, se observaron los vidrios colonizados bajo el microscopio de campo claro. Las fotografías tomadas se muestran a continuación. Todas las imágenes tienen magnificación 400x.

Ensayo de inactivación fotodinámica durante la colonización de superficies.

En las imágenes obtenidas, que se muestran en la figura 4.16, se pueden corroborar algunos de los resultados experimentales obtenidos anteriormente mediante conteos en placa, además de

obtener información adicional. Al comparar cada una de las imágenes en oscuridad con su contraparte irradiada se observa la disminución en el número de bacterias. Esta información no pudo ser constatada estadísticamente.

En la imagen correspondiente al vidrio en oscuridad (figura 4.16a) se puede observar el comienzo de formación de aglomeraciones de bacterias. Dichas estructuras no se observan en ninguna de las otras imágenes. Se ha reportado [127] que la irradiación con luz UV puede inhibir la formación de estas estructuras. Por otro lado, en el caso de los films FilS y FilSiQD-PEG en oscuridad, probablemente existe algún efecto ocasionado por la topología/composición de la película que dificulte la formación de aglomerados bacterianos que conducen a biofilms.

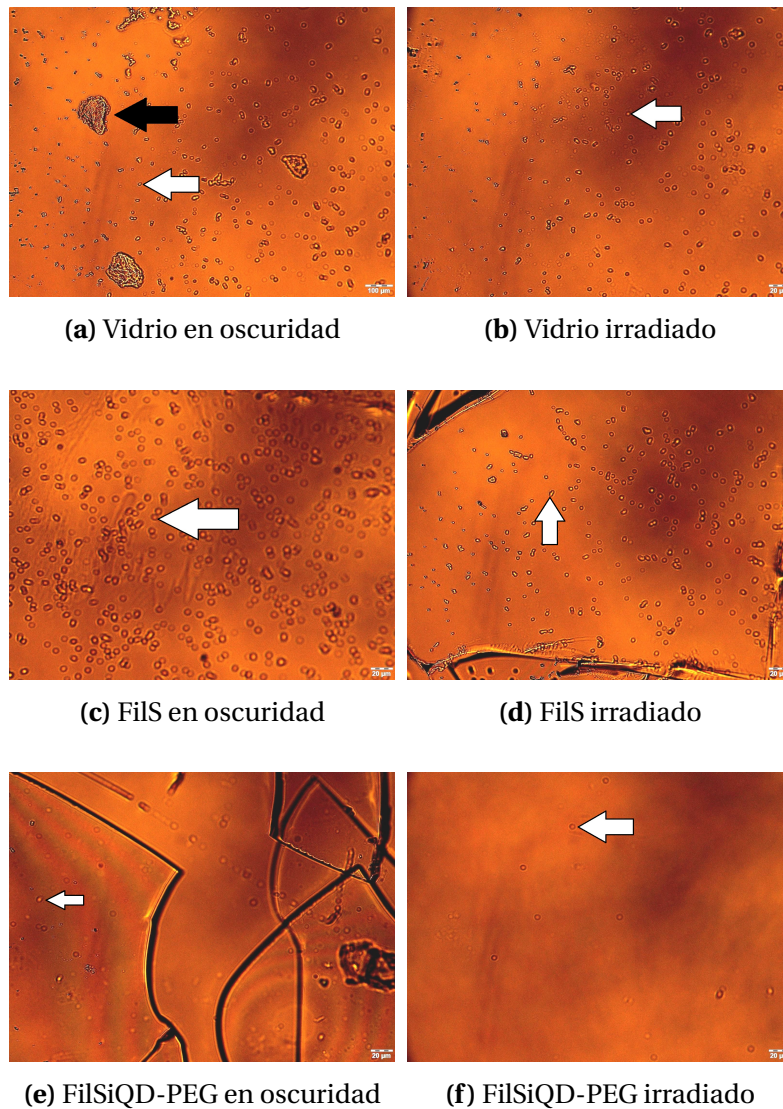


Figura 4.16: Imágenes de campo claro de los vidrios con distintas películas y el vidrio control luego de la adhesión bacteriana, en oscuridad e irradiados (Ensayo A). Se indica la superficie y tratamiento realizado en cada caso. Se señalan bacterias individuales con flechas azules y aglomerados con flechas rojas.

Ensayo de inactivación fotodinámica de biofilms de 2hs

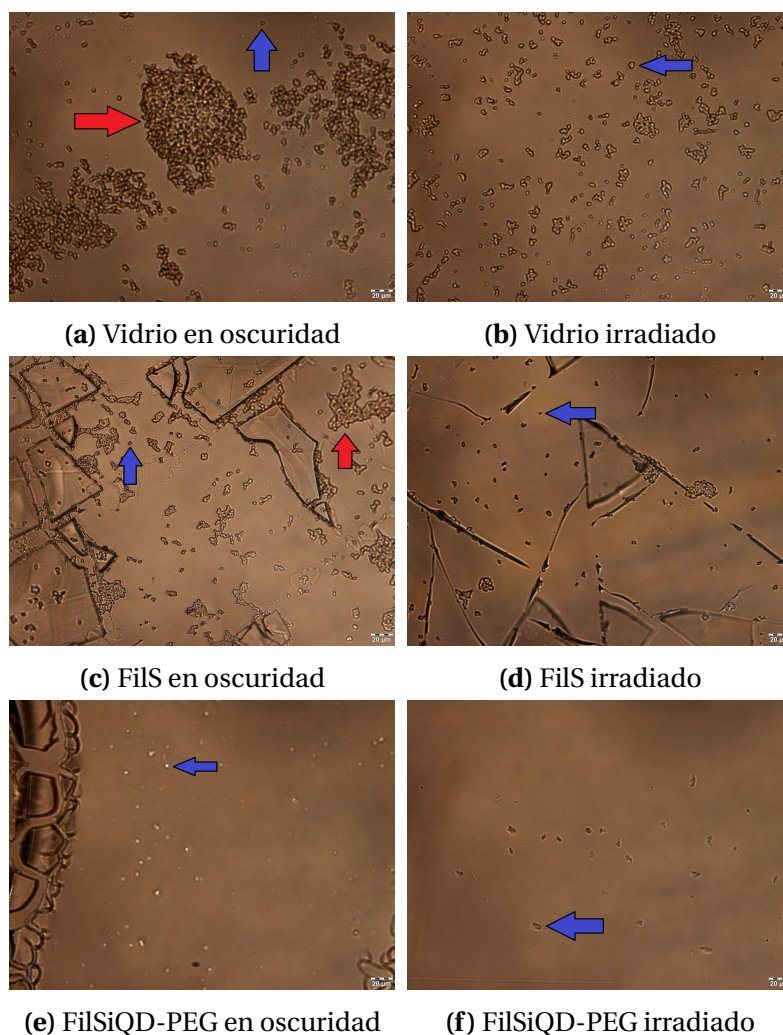


Figura 4.17: Imágenes de campo claro de los vidrios colonizados. Se indica la superficie y tratamiento realizado.

En las imágenes de la figura 4.17 correspondientes al Ensayo B se observa una tendencia similar al experimento anterior (Ensayo A). El mayor grado de colonización se detecta en el vidrio sin modificar donde se notan aglomerados de bacterias de gran tamaño que no se observan en los otros vidrios tratados. Es decir, en este caso las bacterias pudieron adherirse durante la primera parte del ensayo y siguieron creciendo durante las dos horas subsiguientes. En el caso de los vidrios tratados, en cambio, tanto la adhesión como el posterior crecimiento de los acúmulos microbianos se vio disminuido, indicando nuevamente que existe un efecto inhibitorio que puede asociarse tanto a la nanoestructura como a la diferente composición y propiedades fisicoquímicas de la superficie respecto del control. Por otra parte, la estructura de los aglomerados los hizo más resistentes al efecto de la irradiación. Por el contrario, las bacterias adheridas al FilSiQD-PEG, más aisladas, según se ve en las observaciones microscópicas, mostraron mayor vulnerabilidad. Se puede notar también que existe una diferencia considerable en la cantidad de bacterias adheridas a FilS con respecto a las adheridas en la superficie FilSiQD-PEG luego del Ensayo B, resultado que también se constató en el ensayo cuantitativo y que demuestra la importancia del efecto de los QD.

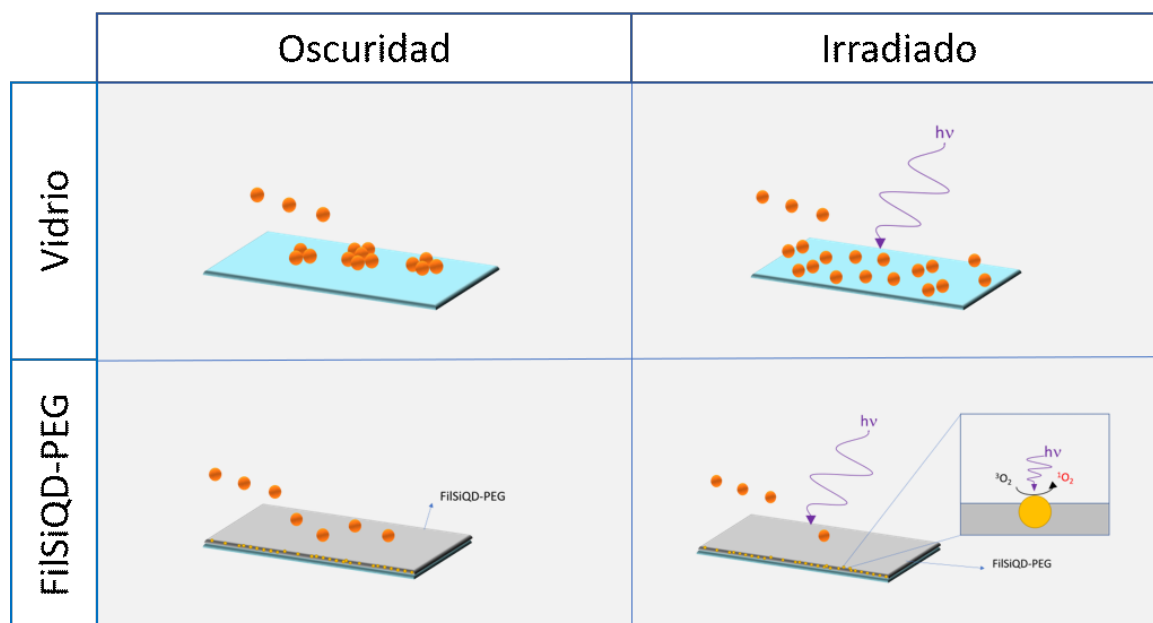


Figura 4.18: Interpretación gráfica de los resultados del Ensayo A, tanto recuentos como microscopías

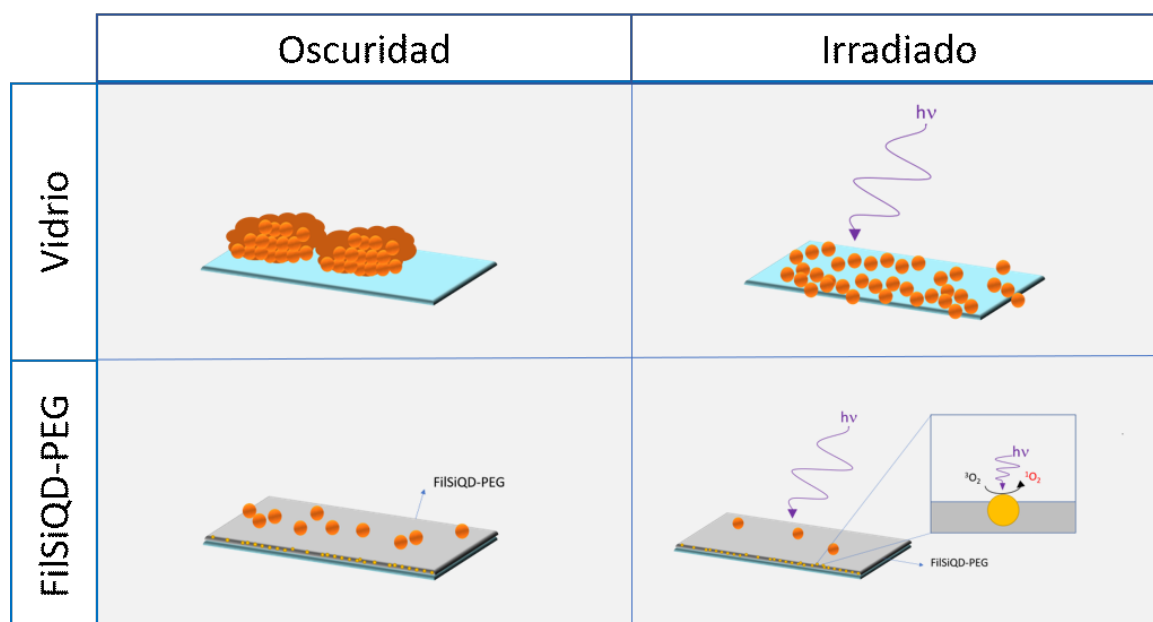


Figura 4.19: Interpretación gráfica de los resultados del Ensayo B, tanto recuentos como microscopías.

Las figuras 4.18 y 4.19 representan esquemáticamente los resultados de los Ensayos A y B (conteos y observaciones microscópicas), respectivamente. En ella pueden identificarse los distintos efectos que ha producido sobre la adhesión y colonización la radiación por sí sola, las superficies FilSiQD-PEG y la radiación sobre las superficies FilSiQD-PEG.

En primera instancia puede notarse que sobre la superficie control adhieren, durante el ensayo A sin irradiar, algo más que 10^5 bacterias. Al irradiar la superficie, el número de bacterias disminuye

ligeramente, pero puede observarse que dichas bacterias están más aisladas, sin formar acúmulos. De ello puede concluirse que la radiación afecta la duplicación y la aglomeración de las bacterias.

En el caso de la superficie FilSiQD-PEG el número de bacterias adheridas sobre el control en oscuridad es menor que en los casos anteriores, indicando que la superficie está jugando un rol importante inhibiendo el proceso de adhesión, efecto que se ve exacerbado en presencia de irradiación.

En el caso del Ensayo B, se forma primeramente un biofilm temprano y, en el caso del control, muestra la formación de acúmulos muy importantes que alcanzan un número de bacterias un orden superior al control del caso A. Esto es debido al mayor tiempo en contacto del biofilm temprano con el medio de cultivo, pues el biofilm formado durante 2 h sigue creciendo en medio estéril en oscuridad durante 2 h más. Cuando durante las últimas dos horas es irradiado puede notarse que dicha irradiación inhibe la formación de agregados y se pueden detectar sólo grupos de pocas bacterias. Si se repite la experiencia con las superficies FilSiQD-PEG se nota que la adhesión inicial es menor que en el caso del control y además quedan muy pocas bacterias vivas adheridas sobre la superficie. Es importante destacar que en este caso se observa un efecto sinérgico de la superficie y la irradiación ya que la superficie disminuye la adhesión, las bacterias quedan aisladas y se vuelven más vulnerables a la radiación y al efecto del oxígeno singlete, produciendo una inhibición superior a la de los efectos individuales.

Cabe mencionar además que las células aisladas constituyen también un blanco más sensible para cualquier otro agente antimicrobiano por lo que la superficie *per se*, sin irradiación, constituye una mejora ya que la acción de un biocida se vería favorecida.

4.5. Conclusiones Parciales

- El análisis comparativo de las propiedades de los films obtenidos por volcado y posterior evaporación con los formados por el método de Dip-Coating permitió constatar que las películas preparadas según este último método presentaban mejores propiedades de adherencia y homogeneidad.

La optimización de las condiciones del método manual de dip-coating permitió obtener superficies de vidrio modificadas con films de sílice conteniendo SiQD-PEG inmovilizadas cuya presencia se verificó por varios métodos.

- Entre los cambios y beneficios observados al incorporar nanopartículas de SiQD-PEG a vidrios modificados con films de sílice se pueden citar:
 - El aumento de la mojabilidad la película.
 - La disminución en la adhesión bacteriana sobre la superficie de FilS y FilSiQD-PEG en oscuridad.
 - La producción de oxígeno singlete desde las películas irradiadas con efecto inhibitorio de la adhesión y/o disminución de la duplicación e incremento de mortandad.
 - La inhibición de la formación de agregados bacterianos sobre la superficie. Esto aumentaría la efectividad de los otros agentes antimicrobianos.
 - El efecto sinérgico FilSiQD-PEG + irradiación, cuya efectividad supera a la suma de los efectos individuales.
 - El efecto antimicrobiano de la producción de oxígeno singlete formado durante la irradiación con luz UV que disminuyó el número de bacterias vivas adheridas en más de

2 órdenes de magnitud. Se comprobó que dicho efecto antimicrobiano es mucho más notorio sobre las bacterias aisladas.

CAPÍTULO

5

CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

5.1. Conclusiones Finales

Este trabajo de tesina fue realizado en torno a evaluar la hipótesis “*Los films nanoestructurados conteniendo nanopartículas de Si semiconductor y biopolímeros son capaces de inhibir la formación de biofilms bacterianos.*”. Para ello se obtuvieron films de sílice poroso conteniendo puntos cuánticos de silicio recubiertos con PEG y se evaluó la inhibición de la adhesión y la capacidad antimicrobiana de los films en oscuridad y bajo irradiación UV frente a *Staphylococcus aureus* como organismo modelo. Las tareas experimentales desarrolladas, sus detalles, y los resultados obtenidos se describen en los Capítulos 2, 3 y 4.

A lo largo del capítulo 3 se resume la síntesis y caracterización de puntos cuánticos de silicio recubiertos con PEG y se evaluó su capacidad de generación de especies reactivas. Como control de los efectos del recubrimiento se utilizaron puntos cuánticos de silicio levemente oxidados en su superficie. Se obtuvieron las matrices de excitación-emisión y se evaluó la estabilidad de ambas partículas. A partir de estos ensayos se podría concluir que la cobertura de PEG no modifica las capacidades fotoluminiscentes del núcleo de Silicio. Adicionalmente, el recubrimiento con PEG mejora la estabilidad de las partículas, permitiendo esterilizarlas en un autoclave.

En el capítulo 4 se describen los procesos de optimización y puesta a punto del protocolo de formación de films sobre superficies de vidrio. A partir de estos ensayos se pudo concluir que la técnica de Dip-Coating resultó efectiva para generar films porosos con puntos cuánticos de Silicio embebidos. La homogeneidad de la película se evaluó por microscopía de epifluorescencia y las superficies se caracterizaron mediante mediciones del ángulo de contacto y espectroscopía UV-VIS y ATR-FTIR. La capacidad de los films de fotosensibilizar ROS se evaluó mediante medidas de la generación de oxígeno singlete y radical anión superóxido. Los films obtenidos contienen gran cantidad de nanopartículas en su interior (evidenciado por su intensa fotoluminiscencia) y son capaces de fotosensibilizar oxígeno singlete.

Hacia el final del capítulo 4 se describen los ensayos microbiológicos desarrollados para evaluar la capacidad de los films obtenidos de inhibir la formación de biofilms bacterianos de *Staphylococcus aureus* en conjunto con la irradiación con luz UV-A. Con este fin se hicieron dos ensayos, en el primero (Ensayo A) se irradiaron los films al mismo tiempo que se ponían en contacto con las superficies modificadas. En el segundo ensayo (Ensayo B) se incubaron las bacterias sobre los films en oscuridad y luego se irradiaron. En ambos casos, los resultados fueron evaluados mediante recuentos y microscopía de campo claro. Si bien en el ensayo A no se pudieron obtener resultados estadísticamente significativos, en el ensayo B se observó una importante disminución del número de bacterias adheridas sobre films de sílice porosa conteniendo puntos cuánticos de silicio al ser irradiados, en comparación con los controles. El estudio de los conteos en conjunto con las imágenes de microscopía parecería indicar un efecto sinérgico entre i) las propiedades superficiales que inducen el aislamiento bacteriano (que hace más sensibles a las bacterias a los tratamientos antimicrobianos) ii) la radiación UV que genera oxígeno singlete.

5.2. Perspectivas futuras

Con el fin de completar y expandir los resultados de este trabajo de tesina se podrían nombrar una serie de ensayos a realizar:

- Evaluar el uso de sistemas automatizados de Dip-Coating para la obtención de films aún más homogéneos.

- Estudiar la topografía y características de rugosidad de los films por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y relacionarlas con la adhesión bacteriana.
- De ser posible, obtener valores de eficiencia cuántica de generación de oxígeno singlete.
- Repetir los ensayos microbiológicos A y B para comprobar si se pueden obtener resultados estadísticamente significativos donde se observan diferencias en los valores medios.
- Profundizar el estudio de la formación de biofilms sobre las películas obtenidas utilizando Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para estudiar la formación de acumulos bacterianos de distinto tipo.

AGRADECIMIENTOS

Al final de este trabajo, y en consecuencia de mi carrera universitaria, existen personas sin las cuales nada de esto habría sido posible. A todas y todos en esta lista les estoy tremendamente agradecido.

Mi directora de tesina, la Dra. Mónica Gonzalez, Gracias por incorporarme y recibirme en el grupo, gracias también por siempre estar disponible para cualquier duda y necesidad, y por ayudarme a entender esta temática que fue totalmente nueva para mi.

Mi co-directora, la Dra. Mónica Fernandez Lorenzo, Gracias por tu colaboración en este trabajo y por siempre estar dispuesta a ayudarme. Gracias también por ayudarme a interpretar los ensayos biológicos.

Mi tutor, el Lic. Damián Rodriguez Sartori, Gracias enormes por tenerme una paciencia interminable y por todo lo que me enseñaste. Gracias también por ayudarme siempre a lo largo de este trabajo.

Al Dr. Alejandro Miñan, por su colaboración en los ensayos biológicos y por *las plegarias y el ayuno!*

A todos los integrantes del LEAR: Belu, Dario, Joaco, Fran, Laura DA, Laura Dittler, Juanjo, Gaby, Hernán, Emi, Lu, Lau y a todos los que ya mencioné por siempre estar dispuestos a ayudarme y acompañarme, y por todas las charlas y momentos compartidos!

A mi familia, Lu, Juli, Claudia y Gustavo, la verdad se me complica expresar todo el amor y gratitud que siento por ustedes en palabras, así que simplemente voy a decir GRACIAS infinitas!

A mi tío Gabo, los sentimientos son iguales que con mi familia, es difícil poner en palabras el agradecimiento que tengo por vos y por todo lo que has hecho por mi y por los que quiero desde que tengo uso de la razón, GRACIAS!

A mi pareja, Vicky, por todo tu amor y cariño todos estos años, gracias por apoyarme siempre y sacarme adelante. Estoy seguro que mi vida hubiera sido mucho peor sin estar a tu lado, GRACIAS!

A mis amigos del CDC, Juanpi, Tyn, Joaco, Vic, Santi, Fran, Fede, Julio, Meli, Tuti y Valen por acompañarme desde que tengo uso de la razón y por haber compartido tantos momentos de enorme felicidad conmigo. Gracias Flor, Lala y Cami por haber sido mis amigas todos estos años.

A mis amigos de Exactas y de Biotec, Juani, Tom, Cami, Angie, Iago, Car, Colo, Baccia, Juli, Ro, Gian, Agus, Lu, Mica, Dixon, Fela, Coti y Pablo por su amistad, por su compañerismo y por su ayuda invaluable en la carrera.

A la cátedra de Introducción a la Química y Química General, a sus coordinadores por darme una oportunidad y a los docentes con los que me ha tocado compartir cátedra estos años.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. T. Mayon-White, G. Duce, T. Kereselidze, and E. Tikomirov. An international survey of the prevalence of hospital-acquired infection. *Journal of Hospital Infection*, 11(SUPPL. A):43–48, 1988.
- [2] World Health Organization. Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide. *World Health Organization*, pages 1–40, 2011.
- [3] R. Douglas Scott. The direct medical costs of healthcare-associated infections in U.S. hospitals and the benefits of prevention. *National and State Healthcare-Associated Infections Progress Report*, page 13, 2009.
- [4] Charis Marwick and Peter Davey. Care bundles: The holy grail of infectious risk management in hospital? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 22(4):364–369, 2009.
- [5] Philip C. Carling and Judene M. Bartley. Evaluating hygienic cleaning in health care settings: What you do not know can harm your patients. *American Journal of Infection Control*, 38(5 SUPPL.):S41–S50, 2010.
- [6] J W Costerton, Z Lewandowski, D E Caldwell, D R Korber, and H M Lappin-Scott. Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 1995.
- [7] Soumya Satpathy, Sudip Kumar Sen, Smaranika Pattanaik, and Sangeeta Raut. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7:56–66, 2016.
- [8] K J Cheng, G G Geesey, T I Ladd, J C Nickel, M Dasgupta, and T J Marrie. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann Rev Microb*, 41:435–464, 1987.
- [9] Luanne Hall-Stoodley, J. William Costerton, and Paul Stoodley. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2):95–108, 2004.
- [10] R Monina Kleven, Melissa A Morrison, Joelle Nadle, Susan Petit, Ken Gershman, Susan Ray, Lee H Harrison, Ruth Lynfield, Ghinwa Dumyati, John M Townes, Allen S Craig, Elizabeth R

- Zell, Gregory E Fosheim, Linda K Mcdougal, Roberta B Carey, and Scott K Fridkin. Invasive Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infections in the United States.
- [11] G A Noskin, R J Rubin, J J Schentag, J Kluytmans, E C Hedblom, M Smulders, E Lapetina, and E Gemmen. The burden of Staphylococcus aureus infections on hospitals in the United States: an analysis of the 2000 and 2001 Nationwide Inpatient Sample Database. *Arch.Intern.Med.*, 165(0003-9926 (Print)):1756–1761, 2005.
 - [12] J. H.T. Wagenvoort, E. I.G.B. De Brauwier, R. J.R. Penders, R. J. Willems, J. Top, and M. J. Bonten. Environmental survival of vancomycin-resistant Enterococcus faecium. *Journal of Hospital Infection*, 77(3):282–283, 2011.
 - [13] MP Jevons. Çelbeninresistant Staphylococci, 1961.
 - [14] D. M. Livermore. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Pseudomonas aeruginosa: Our Worst Nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, 34(5):634–640, 2002.
 - [15] James H. Jorgensen. Update on mechanisms and prevalence of antimicrobial resistance in haemophilus influenzae. *Clinical Infectious Diseases*, 14(5):1119–1123, 1992.
 - [16] Christian Brun-Buisson, Alain Philippon, Muriel Ansquer, Patrick Legrand, Francoise Montravers, and Jean Duval. Transferable Enzymatic Resistance To Third-Generation Cephalosporins During Nosocomial Outbreak of Multiresistant Klebsiella Pneumoniae. *The Lancet*, 330(8554):302–306, 1987.
 - [17] Marlieke E.A. De Kraker, Martin Wolkewitz, Peter G. Davey, and Hajo Grundmann. Clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: Excess mortality and length of hospital stay related to methicillin-resistant Staphylococcus aureus bloodstream infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(4):1598–1605, 2011.
 - [18] Cassandra D. Salgado, Naomi O’Grady, and Barry M. Farr. Prevention and control of antimicrobial-resistant infections in intensive care patients. *Critical Care Medicine*, 33(10):2373–2382, 2005.
 - [19] M. E.A. de Kraker, M. Wolkewitz, P. G. Davey, W. Koller, J. Berger, J. Nagler, C. Icket, S. Kalenic, J. Horvatic, H. Seifert, A. Kaasch, O. Paniara, A. Argyropoulou, M. Bompola, E. Smyth, M. Skally, A. Raglio, U. Dumpis, A. Melbarde Kelmere, M. Borg, D. Xuereb, M. C. Ghita, M. Noble, J. Kolman, S. Grabljevec, D. Turner, L. Lansbury, and H. Grundmann. Burden of antimicrobial resistance in European hospitals: Excess mortality and length of hospital stay associated with bloodstream infections due to Escherichia coli resistant to third-generation cephalosporins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(2):398–407, 2011.
 - [20] Ralf Kuhlen, R Moreno, M Ranieri, and A Rhodes. *25 years of progress and innovation in intensive care medicine*. Medizinisch Wissenschaftliche verlagsgesellschaft, 2007.
 - [21] J Carlet, A Ben Ali, A Tabah, V Willems, F Philippart, A Chafine, M Garrouste-Orgeas, and B Misset. Multidrug resistant infections in the ICU: mechanisms, prevention and treatment. In 25 Years of progress and innovation in intensive care medicine. Edited by: Kuhlen R, Moreno R, Ranieri VM, Rhodes A, 2007.

- [22] Jose A. Sanclement, Paul Webster, John Thomas, and Hassan H. Ramadan. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 115(4):578–582, 2005.
- [23] Matthew R. Parsek and Clay Fuqua. Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *Journal of Bacteriology*, 186(14):4427–4440, 2004.
- [24] Hassan H. Ramadan, Jose A. Sanclement, and John G. Thomas. Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 132(3):414–417, 2005.
- [25] Rodney M. Donlan. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8):1387–1392, 2001.
- [26] M Esperanza Cortés, J Consuegra Bonilla, and R Dario Sinisterra. Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 2:896–905, 2011.
- [27] P. S. Stewart and J. W. Costerton. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet (London, England)*, 358(9276):135–8, 2001.
- [28] Niels Høiby, Thomas Bjarnsholt, Michael Givskov, Søren Molin, and Oana Ciofu. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4):322–332, 2010.
- [29] Thien-Fah C Mah and George A O Toole. Mah & OToole, 2001. *Trends in Microbiology*, 9(1):34–39, 2001.
- [30] Michael RM Ranieri, Cynthia B. Whitchurch, and Lori L. Burrows. Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Current Opinion in Microbiology*, 45:164–169, 2018.
- [31] J. A. Otter, K. Vickery, J. T. Walker, E. deLancey Pulcini, P. Stoodley, S. D. Goldenberg, J. A.G. Salkeld, J. Chewins, S. Yezli, and J. D. Edgeworth. Surface-attached cells, biofilms and bio-cide susceptibility: Implications for hospital cleaning and disinfection. *Journal of Hospital Infection*, 89(1):16–27, 2015.
- [32] Russell D. Monds and George A. O’Toole. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, 17(2):73–87, 2009.
- [33] W. G. Characklis. Bioengineering report: Fouling biofilm development: A process analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(9):1923–1960, 1981.
- [34] Mathias Herrmann, Pierre E. Vaudaux, Didier Pittet, Raymond Auckenthaler, P. Daniel Lew, Françoise Schumacher-Perdreau, Georg Peters, and Francis A. Waldvogel. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *Journal of Infectious Diseases*, 158(4):693–701, 1988.
- [35] P R Rutter. The physical chemistry of the adhesion of bacteria and other cells. *Cell adhesion and motility*, pages 103–135, 1980.
- [36] A Lips and N E Jessup. *Colloidal aspects of bacterial adhesion*. New York: Academic Press, 1979.

- [37] George I. Bell. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200(4342):618–627, 1978.
- [38] P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies, and J. W. Costerton. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, 56(1):187–209, 2002.
- [39] Luanne Hall-Stoodley and Paul Stoodley. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends in Microbiology*, 13(1):7–10, 2005.
- [40] Paul Stoodley, R. Cargo, C. J. Rupp, S. Wilson, and I. Klapper. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(6):361–367, 2002.
- [41] Stephen M. Hunt, Martin A. Hamilton, John T. Sears, Gary Harkin, and Jason Reno. A computer investigation of chemically mediated detachment in bacterial biofilms. *Microbiology*, 149(5):1155–1163, 2003.
- [42] Christopher Walsh. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406(6797):775–781, 2000.
- [43] Jeff N Anderl, Michael J Franklin, and Philip S Stewart. Role of Antibiotic Penetration Limitation in. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7):1818–1824, 2000.
- [44] J C Nickel, I Ruseska, J B Wright, and J W Costerton. Tobramycin Resistance of Pseudomonas-Aeruginosa Cells Growing As a Biofilm on Urinary Catheter Material. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 27(4):619–624, 1985.
- [45] Philip S Stewart. Diffusion in biofilms: Why is diffusion an important process? *Journal of Bacteriology*, 185(5):1485–1491, 2003.
- [46] David Davies. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2):114–122, 2003.
- [47] Hiromi Kumon, Ken Ichi Tomochika, Tosiya Matunaga, Hiroyuki Ohmori, and Masatoshi Ogawa. A Sandwich Cup Method for the Penetration Assay of Antimicrobial Agents through Pseudomonas Exopolysaccharides. *Microbiology and Immunology*, 38(8):615–619, 1994.
- [48] Dirk de Beer, Paul Stoodley, Frank Roe, and Zbigniew Lewandowski. Effects of Biofilm Structures on Oxygen Distribution and Mass Transport. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(11):1131–1138, 1994.
- [49] Kenneth J. Tack and L. D. Sabath. Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin. *Chemotherapy*, 31(3):204–210, 1985.
- [50] Kim Lewis. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(4):999–1007, 2001.
- [51] Richard W Compans and Max D Cooper. *Bacterial Biofilms*, volume 322 of *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008.
- [52] M P Hurtado, M A De La Parte, and A Brito. Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22(2):112–118, 2002.

- [53] Gregory J. Moran, Anusha Krishnadasan, Rachel J. Gorwitz, Gregory E. Fosheim, Linda K. McDougal, Roberta B. Carey, and David A. Talan. Methicillin-Resistant *S. aureus* Infections among Patients in the Emergency Department. *New England Journal of Medicine*, 355(7):666–674, 2006.
- [54] Steven Solomon, Teresa Horan, Mary Andrus, Jonathan Edwards, Grace Emori, Scott Fridkin, Gloria Peavy, James Tolson, Saila Upadhyayula, and Bryan Yi. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002. *American Journal of Infection Control*, 30(8):458–475, 2002.
- [55] R. M. Klevens, J. R. Edwards, F. C. Tenover, L. C. McDonald, T. Horan, and R. Gaynes. Changes in the Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Intensive Care Units in US Hospitals, 1992-2003. *Clinical Infectious Diseases*, 42(3):389–391, 2006.
- [56] D. C.E. Speller, A. P. Johnson, D. James, R. R. Marples, A. Charlett, and R. C. George. Resistance to methicillin and other antibiotics in isolates of *Staphylococcus aureus* from blood and cerebrospinal fluid, England and Wales, 1989-95. *Lancet*, 350(9074):323–325, 1997.
- [57] K. Vickery, A. Deva, A. Jacombs, J. Allan, P. Valente, and I. B. Gosbell. Presence of biofilm containing viable multiresistant organisms despite terminal cleaning on clinical surfaces in an intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, 80(1):52–55, 2012.
- [58] C. A. Fux, J. W. Costerton, P. S. Stewart, and P. Stoodley. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1):34–40, 2005.
- [59] Mario Salwiczek, Yue Qu, James Gardiner, Richard A. Strugnell, Trevor Lithgow, Keith M. McLean, and Helmut Thissen. Emerging rules for effective antimicrobial coatings. *Trends in Biotechnology*, 32(2):82–90, 2014.
- [60] Hwang Soo Joo and Michael Otto. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chemistry and Biology*, 19(12):1503–1513, 2012.
- [61] Jafar Hasan, Russell J. Crawford, and Elena P. Ivanova. Antibacterial surfaces: The quest for a new generation of biomaterials. *Trends in Biotechnology*, 31(5):295–304, 2013.
- [62] Mary V. Graham, Aaron P. Mosier, Thomas R. Kiehl, Alain E. Kaloyeros, and Nathaniel C. Cady. Development of antifouling surfaces to reduce bacterial attachment. *Soft Matter*, 9(27):6235–6244, 2013.
- [63] Carolina Díaz, María Cecilia Cortizo, Patricia Laura Schilardi, Sandra Gabriela Gómez de Saravia, and Mónica Alicia Fernández Lorenzo de Mele. Influence of the nano-micro structure of the surface on bacterial adhesion. *Materials Research*, 10(1):11–14, 2007.
- [64] K. A. Whitehead and J. Verran. The effect of surface topography on the retention of microorganisms. *Food and Bioproducts Processing*, 84(4 C):253–259, 2006.
- [65] Carolina Díaz, Patricia Schilardi, and Mónica Fernández Lorenzo De Mele. Influence of surface sub-micropattern on the adhesion of pioneer bacteria on metals. *Artificial Organs*, 32(4):292–298, 2008.

- [66] Carolina Díaz, Patricia L. Schilardi, Paula C. Dos Santos Claro, Roberto C. Salvarezza, and Mónica A. Fernández Lorenzo De Mele. Submicron trenches reduce the *Pseudomonas fluorescens* colonization rate on solid surfaces. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 1(1):136–143, 2009.
- [67] C. Díaz, A. Miñán, P. L. Schilardi, and M. Fernández Lorenzo De Mele. Synergistic antimicrobial effect against early biofilm formation: Micropatterned surface plus antibiotic treatment. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(3):221–226, 2012.
- [68] C. Adlhart, J. Verran, N. F. Azevedo, H. Olmez, M. M. Keinänen-Toivola, I. Gouveia, L. F. Melo, and F. Crijns. Surface modifications for antimicrobial effects in the healthcare setting: a critical overview. *Journal of Hospital Infection*, 99(3):239–249, 2018.
- [69] Xiaoxue Zhang, Ling Wang, and Erkki Levänen. Superhydrophobic surfaces for the reduction of bacterial adhesion. *RSC Adv.*, 3(30):12003–12020, 2013.
- [70] Carolina Díaz, Roberto C. Salvarezza, Mónica A. Fernández Lorenzo De Mele, and Patricia L. Schilardi. Organization of *pseudomonas fluorescens* on chemically different nano/microstructured surfaces. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2(9):2530–2539, 2010.
- [71] Vassilia Zorba, Emmanuel Stratakis, Marios Barberoglou, Emmanuel Spanakis, Panagiotis Tzanetakis, Spiros H. Anastasiadis, and Costas Fotakis. Biomimetic artificial surfaces quantitatively reproduce the water repellency of a lotus leaf. *Advanced Materials*, 20(21):4049–4054, 2008.
- [72] Mohamed A. Samaha, Hooman Vahedi Tafreshi, and Mohamed Gad-el Hak. Superhydrophobic surfaces: From the lotus leaf to the submarine. *Comptes Rendus - Mecanique*, 340(1-2):18–34, 2012.
- [73] Livia Visai, Luigi de Nardo, Carlo Punta, Lucio Melone, Alberto Cigada, Marcello Imbriani, and Carla Renata Arciola. Titanium oxide antibacterial surfaces in biomedical devices. *International Journal of Artificial Organs*, 34(9):929–946, 2011.
- [74] K. G. Kristinsson, B. Jansen, U. Treitz, F. Schumacher-Perdreau, G. Peters, and G. Pulverer. Antimicrobial Activity of Polymers Coated with Iodine-Complexed Polyvinylpyrrolidone. *Journal of Biomaterials Applications*, 5(3):173–184, 1991.
- [75] Chou Hon Ho, Jan Tobis, Christina Sprich, Ralf Thomann, and Joerg C. Tiller. Nanoseparated polymeric networks with multiple antimicrobial properties. *Advanced Materials*, 16(12):957–961, 2004.
- [76] Jai S. Rudra, Komal Dave, and Donald T. Haynie. Antimicrobial polypeptide multilayer nanocoatings. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17(11):1301–1315, 2006.
- [77] Hans Gollwitzer, Karim Ibrahim, Henriette Meyer, Wolfram Mittelmeier, Raymonde Busch, and Axel Stemberger. Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(3):585–591, 2003.
- [78] J. C. Tiller, C.-J. Liao, K. Lewis, and A. M. Klibanov. Designing surfaces that kill bacteria on contact. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11):5981–5985, 2001.

- [79] John-Bruce D. Green, Timothy Fulghum, and Mark A. Nordhaus. A review of immobilized antimicrobial agents and methods for testing. *Biointerphases*, 6(4):MR13–MR28, 2011.
- [80] Ana L. Santos, Newton C.M. Gomes, Isabel Henriques, Adelaide Almeida, António Correia, and Ângela Cunha. Contribution of reactive oxygen species to UV-B-induced damage in bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 117:40–46, 2012.
- [81] Elisa Cabiscol, Jordi Tamarit, and Joaquim Ros. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 2000.
- [82] Akira Fujishima, Xintong Zhang, and Donald A. Tryk. TiO₂ photocatalysis and related surface phenomena. *Surface Science Reports*, 63(12):515–582, 2008.
- [83] Calvin D Jaeger and Allen J Bard. Spin Trapping and Electron Spin Resonance Detection of Radical Intermediates in the Photodecomposition of Water at TiO₂ Particulate Systems. *The Journal of Physical Chemistry*, 83(24):3146–3152, 1979.
- [84] Michael Wilson. Light-Activated Antimicrobial Coating for the Continuous Disinfection of Surfaces. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 24(10):782–784, oct 2003.
- [85] Oscar Raab. Über die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien. *Z. biol.*, 39:524–546, 1900.
- [86] International Union of Pure and Applied Chemistry. IUPAC Compendium of Chemical Terminology – The Gold Book, 2009.
- [87] Leanne B. Josefsen and Ross W. Boyle. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Metal-Based Drugs*, 2008, 2008.
- [88] F. W. Wise. Lead salt quantum dots: The limit of strong quantum confinement. *Accounts of Chemical Research*, 33(11):773–780, 2000.
- [89] Oleg V Salata. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of nanobiotechnology*, 2(3):12, dec 2004.
- [90] L Zhang, F X Gu, J M Chan, A Z Wang, R S Langer, and O C Farokhzad. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 83(5):761–9, may 2008.
- [91] Paula Judith Perez Espitia, Nilda de Fátima Ferreira Soares, Jane Sélia dos Reis Coimbra, Nélio José de Andrade, Renato Souza Cruz, and Eber Antonio Alves Medeiros. Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5):1447–1464, 2012.
- [92] Eric Dickinson. Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions. *Trends in Food Science and Technology*, 24(1):4–12, 2012.
- [93] D. Derkacs, S. H. Lim, P. Matheu, W. Mar, and E. T. Yu. Improved performance of amorphous silicon solar cells via scattering from surface plasmon polaritons in nearby metallic nanoparticles. *Applied Physics Letters*, 89(9):1–4, 2006.
- [94] W. J. E. Beek, M. M. Wienk, and R. A. J. Janssen. Efficient Hybrid Solar Cells from Zinc Oxide Nanoparticles and a Conjugated Polymer. *Advanced Materials*, 16(12):1009–1013, jun 2004.

- [95] Zhenhui Kang, Chi Him A Tsang, Ning-Bew Wong, Zhendong Zhang, and Shuit-Tong Lee. Silicon Quantum Dots: A General Photocatalyst for Reduction, Decomposition, and Selective Oxidation Reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 129(40):12090–12091, oct 2007.
- [96] A. P. Alivisatos. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science*, 271(5251):933–937, 1996.
- [97] Manuel J. Llansola Portolés, Felipe Rodriguez Nieto, Delia B. Soria, Javier I. Amalvy, Pablo J. Peruzzo, Daniel O. Mártire, Mónica Kotler, Oliver Holub, and Mónica C. Gonzalez. Photophysical properties of blue-emitting silicon nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 2009.
- [98] Norah O’Farrell, Andrew Houlton, and Benjamin R. Horrocks. Silicon nanoparticles: Applications in cell biology and medicine. *International Journal of Nanomedicine*, 1(4):451–472, 2006.
- [99] Jianwei Liu, Folarin Erogbogbo, Ken-Tye Yong, Ling Ye, Jing Liu, Rui Hu, Hongyan Chen, Yazhuo Hu, Yi Yang, and Jinghui Yang. Assessing Clinical Prospects of Silicon Quantum Dots: Acute Doses in Mice Prove Safe in Monkeys. *ACS Nano*, pages 7303–7310, 2013.
- [100] Ji Ho Park, Luo Gu, Geoffrey Von Maltzahn, Erkki Ruoslahti, Sangeeta N. Bhatia, and Michael J. Sailor. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications. *Nature Materials*, 8(4):331–336, 2009.
- [101] Manuel J. Llansola Portolés, Reinaldo Pis Diez, María L. Dell’Arciprete, Paula Caregnato, Juan José Romero, Daniel O. Mártire, Omar Azzaroni, Marcelo Ceolín, and Mónica C. Gonzalez. Understanding the parameters affecting the photoluminescence of silicon nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 116(20):11315–11325, 2012.
- [102] Gunter Schmid and Others. *Nanoparticles*. Wiley VCH, 2005.
- [103] Manuel J. Llansola Portolés, Pedro M. David Gara, Mónica L. Kotler, Sonia Bertolotti, Enrique San Román, Hernán B. Rodríguez, and Mónica C. Gonzalez. Silicon nanoparticle photophysics and singlet oxygen generation. *Langmuir*, 2010.
- [104] Juan J. Romero, Manuel J. Llansola-Portolés, María Laura Dell’Arciprete, Hernán B. Rodríguez, Ana L. Moore, and Mónica C. Gonzalez. Photoluminescent 1–2 nm sized silicon nanoparticles: A surface-dependent system. *Chemistry of Materials*, 2013.
- [105] Cristian R. Lillo, Juan J. Romero, Manuel Llansola Portolés, Reinaldo Pis Diez, Paula Caregnato, and Mónica C. Gonzalez. Organic coating of 1–2-nm-size silicon nanoparticles: Effect on particle properties. *Nano Research*, 8(6):2047–2062, 2015.
- [106] Ji Chen, Scott K. Spear, Jonathan G. Huddleston, and Robin D. Rogers. Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. *Green Chemistry*, 7(2):64–82, 2005.
- [107] Norma A. Alcantar, Eray S. Aydil, and Jacob N. Israelachvili. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(3):343–351, 2000.

- [108] Akira Shimotoyodome, Takashi Koudate, Hisataka Kobayashi, Junji Nakamura, Ichiro Tokimitsu, Tadashi Hase, Takashi Inoue, Takashi Matsukubo, and Yoshinori Takaesu. Reduction of *Streptococcus mutans* adherence and dental biofilm formation by surface treatment with phosphorylated polyethylene glycol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10):3634–3641, 2007.
- [109] Tobias Ekblad, Gunnar Bergström, Thomas Ederth, Sheelagh L. Conlan, Robert Mutton, Anthony S. Clare, Su Wang, Yunli Liu, Qi Zhao, Fraddy D’Souza, Glen T. Donnelly, Peter R. Willemsen, Michala E. Pettitt, Maureen E. Callow, James A. Callow, and Bo Liedberg. Poly(ethylene glycol)-containing hydrogel surfaces for antifouling applications in marine and freshwater environments. *Biomacromolecules*, 9(10):2775–2783, 2008.
- [110] Baiyan Dong, Sorin Manolache, A. C L Wong, and Ferencz S. Denes. Antifouling ability of polyethylene glycol of different molecular weights grafted onto polyester surfaces by cold plasma. *Polymer Bulletin*, 66(4):517–528, 2011.
- [111] Baiyan Dong, Sorin Manolache, Eileen B. Somers, Amy C. Lee Wong, and Ferencz S. Denes. Generation of antifouling layers on stainless steel surfaces by plasma-enhanced crosslinking of polyethylene glycol. *Journal of Applied Polymer Science*, 97(2):485–497, 2005.
- [112] Markus Antonietti and Christine Göltner. Superstructures of Functional Colloids: Chemistry on the Nanometer Scale. *Angewandte Chemie (International Edition in English)*, 36(9):910–928, 1997.
- [113] Hidenori Otsuka, Yukio Nagasaki, and Kazunori Kataoka. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.):246–255, 2012.
- [114] Daniela Pozzi, Valentina Colapicchioni, Giulio Caracciolo, Susy Piovesana, Anna Laura Capriotti, Sara Palchetti, Stefania De Grossi, Anna Riccioli, Heinz Amenitsch, and Aldo Laganà. Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain length on the bio-nano- interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids: From nanostructure to uptake in cancer cells. *Nanoscale*, 6(5):2782–2792, 2014.
- [115] M. C. Bautista and A. Morales. Silica antireflective films on glass produced by the sol-gel method. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 80(2):217–225, 2003.
- [116] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch. *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*. 1998.
- [117] Sooyeon Kim, Mamoru Fujitsuka, and Tetsuro Majima. Photochemistry of singlet oxygen sensor green (supporting information). *Journal of Physical Chemistry B*, 117(45):13985–13992, 2013.
- [118] K. Tanaka, T. Miura, N. Umezawa, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi, and T. Nagano. Rational design of fluorescein-based fluorescence probes. Mechanism-based design of a maximum fluorescence probe for singlet oxygen. *Journal of the American Chemical Society*, 123(11):2530–2536, 2001.
- [119] Charles C Allain, Lucy S Poon, Cicely S G Chan, W Richmond, and Paul C Fu. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clinical Chemistry*, 20(4):470 LP – 475, apr 1974.

- [120] Luciano Carlos. *Estudio de la eficiencia de degradación de contaminantes empleando tecnologías de oxidación avanzada: Procesos Fenton y foto-Fenton*. PhD thesis, Universidad Nacional de La Plata, 2009.
- [121] L E Scriven. Physics and Applications of Dip Coating and Spin Coating. *Better Ceramics Through Chemistry III*, 121:717–729, 1988.
- [122] A. Marmur. *Contact Angle, Wettability and Adhesion, Volume 6*, volume 16. 2009.
- [123] Damián Rodríguez Sartori, Cristian R. Lillo, Juan J. Romero, María Laura Dellarciprete, Alejandro Miñán, Mónica Fernández Lorenzo De Mele, and Mónica C. Gonzalez. Polyethylene glycol-coated blue-emitting silicon dots with improved properties for uses in aqueous and biological environments. *Nanotechnology*, 27(47):1–11, 2016.
- [124] Jinmyoung Joo, Jose F. Cruz, Sanahan Vijayakumar, Joel Grondek, and Michael J. Sailor. Photoluminescent Porous Si/SiO₂ Core/Shell Nanoparticles Prepared by Borate Oxidation. *Advanced Functional Materials*, 24(36):5688–5694, 2014.
- [125] Donald F. Gerson and D. Scheer. Cell surface energy, contact angles and phase partition III. Adhesion of bacterial cells to hydrophobic surfaces. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 602(3):506–510, 1980.
- [126] James H Pringle and Madilyn Fletcher. Influence of Substratum Wettability on Attachment of Fresh- Water Bacteria to Solid-Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(3):811–817, 1983.
- [127] Mohamed O. Elasri and Robert V. Miller. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5):2025–2031, 1999.